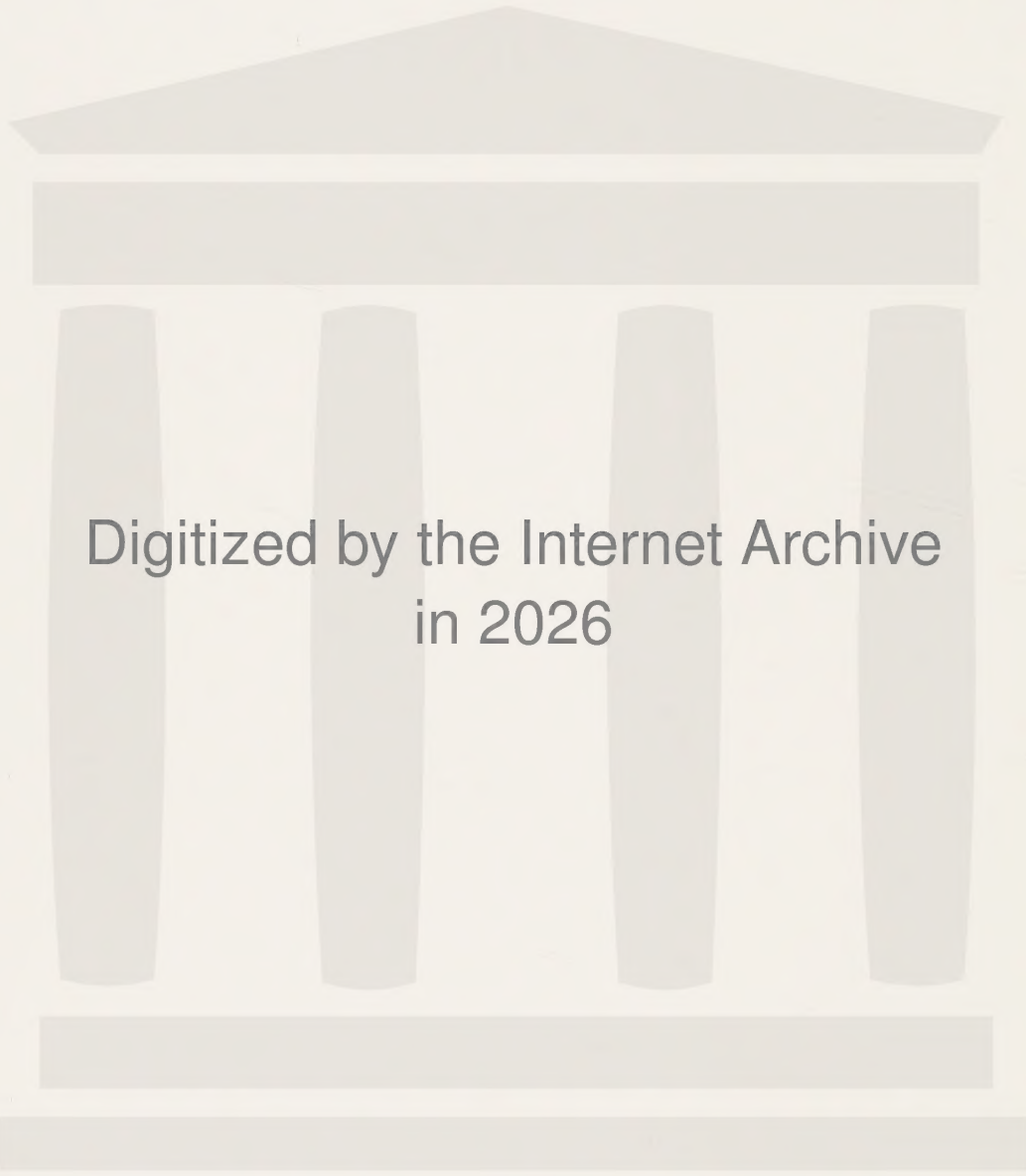


BIOCHEMISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE STUDIEN
ÜBER DIE TYROSINSULFATIERUNG VON PROTEINEN

VON

PATRICK A. BAEUERLE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555422_0029

BIOCHEMISCHE UND ZELLBIOLOGISCHE STUDIEN
ÜBER DIE TYROSINSULFATIERUNG VON PROTEINEN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Diplom-Biologe Patrick A. Baeuerle
aus Friedrichshafen

1986

1. Berichterstatter:

Prof Dr. Hans Thoenen
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
Abteilung für Neurochemie
Am Klopferspitz 18a
8033 Martinsried

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Guido Hartmann
Ludwig-Maximilians-Universität München
Fakultät für Chemie und Pharmazie
Karlstr. 23
8000 München 2

Datum der mündlichen Prüfung:

9. Februar, 1987

Die vorliegende Arbeit wurde im April 1983 im Labor von Dr. Wieland Huttner am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in Martinsried begonnen, im September 1985 im neuen Labor von Dr. Huttner am Europäischen Laboratorium für Molekularbiologie in Heidelberg fortgesetzt und dort im Herbst 1986 abgeschlossen.

Auszüge aus der vorgelegten Arbeit wurden bereits veröffentlicht, sind als Manuskripte zur Veröffentlichung vorgelegt oder in Vorbereitung:

(1) P. A. Baeuerle und W. B. Huttner (1984): Inhibition of N-glycosylation induces tyrosine sulfation of hybridoma immunoglobulin G. EMBO J. 3: 2209 - 2215

(2) P. A. Baeuerle und W. B. Huttner (1985): Tyrosine sulfation of yolk proteins 1, 2 and 3 in *Drosophila melanogaster*. J. Biol. Chem. 260: 6434-6439

(3) P. A. Baeuerle, F. Lottspeich und W. B. Huttner : Tyrosine 172 is the exclusive site of tyrosine sulfation in yolk protein 2 of *Drosophila melanogaster*. Manuskript in Vorbereitung

(4) P. A. Baeuerle und W. B. Huttner : Tyrosine sulfation of hybridoma IgM heavy chain occurs in the trans Golgi network. Manuskript in Vorbereitung

(5) P. A. Baeuerle und W. B. Huttner (1986): Chlorate - a potent inhibitor of protein sulfation in intact cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., im Druck

(6) W. B. Huttner, P. A. Baeuerle, U. M. Benedum, E. Friederich, A. Hille, R. W. H. Lee, P. Rosa, U. Seydel und C. Suchanek (1986): Protein sulfation on tyrosine. In: Hormones and Cell Regulation, J. Nunez et al. (Hrsg.) Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd., 139: 199-217

(7) W. B. Huttner und P. A. Baeuerle (1986): Sulfation of proteins on tyrosine. In: Modern Cell Biology, B. Satir (Hrsg.), Alan R. Liss Inc., New York, Vol 5., im Druck

(8) W.B. Huttner, P. A. Baeuerle, A. Hille, R. W. H. Lee und P. Rosa (1986): Protein Sulfation on Tyrosine. In: Post-translational Modifications. A Laboratory Manual. W. B. Huttner (Hrsg.). Erschienen zum EMBO-Kurs über Post-translationale Modifikationen (Heidelberg, 31.August - 12.September, 1986) S. 158-190

(9) E. Friederich, P. A. Baeuerle, H. Garoff, B. Hovemann und W. B. Huttner: Expression, tyrosine sulfation, and secretion of an insect secretory protein, *Drosophila* vitellogenin 2, in mouse fibroblasts. Manuskript in Vorbereitung

(10) U. M. Benedum, P. A. Baeuerle, D. S. Konecki, R. Frank, J. Powell, J. Mallet und W. B. Huttner (1986): The primary structure of chromogranin A: a representative of a class of acidic secretory proteins common to a variety of peptidergic cells. EMBO J. 5: 1495-1502

DANKSAGUNGEN

Wieland Huttner sage ich Dank für eine exzellente Ausbildung, eine intensive Betreuung meiner Arbeit, für viele anregende Diskussionen und ein sehr offenes und persönliches Arbeitsverhältnis.

Herrn Prof. Dr. Hans Thoenen danke ich für ein Promotionsstipendium der Max-Planck-Gesellschaft und für die Betreuung meiner Promotion.

Allen meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für viele hilfreiche Diskussionen, eine sehr gute Arbeitsatmosphäre und Hilfestellungen während meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Guido Hartmann danke ich für die Betreuung meiner Promotion.

Dr. Bernd Hovemann, Juliane Hesse und Thomas Rau danke ich für eine großzügige Versorgung mit Fruchtfliegen während meiner Experimente.

Dr. Friederich Lottspeich danke ich für die Einführung in die HPLC-Technik und seine Bereitschaft, mich an seinen Geräten arbeiten zu lassen.

Meiner Frau Anette danke ich für ihre Liebe, ihre Geduld und ihr Verständnis während meiner Promotionszeit, und meinen Eltern dafür, daß sie mir das Studium der Biologie ermöglicht haben.

gewidmet meiner Frau Anette

D I E S T R U K T U R D E R A R B E I T

EINLEITUNG

MATERIALIEN UND METHODEN

E R S T E R T E I L : Das Enzym

KAPITEL 1: Das Vorkommen der Tyrosinsulfatierung von Proteinen in verschiedenen Spezies

KAPITEL 2: Die subzelluläre Lokalisation der Tyrosinsulfatierung von Proteinen

KAPITEL 3: Die Konsensusstruktur der Tyrosinsulfatierung

KAPITEL 4: Der Einfluß der N-Glykosylierung auf die Tyrosinsulfatierung von Proteinen

Z W E I T E R T E I L : Ansätze um die Funktionen der Tyrosinsulfatierung zu untersuchen

KAPITEL 5: Die Dotterproteine von *Drosophila melanogaster* als Modellproteine zum Studium der Tyrosinsulfatierung von Proteinen

KAPITEL 6: Die Identifizierung der Tyrosinsulfatierungsstelle in Dotterprotein 2

KAPITEL 7: Chlorat - ein Inhibitor der Tyrosinsulfatierung in intakten Zellen

LITERATURVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1-3
ZUSAMMENFASSUNG	4-7
EINLEITUNG	8-33
1. Kovalente, post-translationale Modifikationen von Aminosäureresten in Proteinen	8
2. Kovalente Modifikationen an Tyrosinresten in Proteinen	20
2.1. Die Tyrosinsulfatierung von Proteinen	21
2.1.1. Vorkommen	21
2.1.2. Gemeinsamkeiten der modifizierten Proteinsubstrate	24
2.1.3. Subzelluläre Lokalisation der Tyrosinsulfatierung	25
2.1.4. Irreversibilität der Tyrosinsulfatierung	26
2.1.5. Die Enzymologie der Tyrosinsulfatierung	27
2.1.6. Biologische Funktionen der Tyrosinsulfatierung	29
3. Zielsetzung der Promotionsarbeit	32
MATERIALIEN UND METHODEN	34-55
1. Radiochemikalien	34
2. In vivo-Markierungen mit anorganischem Sulfat	
2.1. In vivo-Markierung von Hefezellen	34
2.2. In vivo-Markierung von Paramaecium-Zellen	35
2.3. In vivo-Markierung der Wegschnecke Arion spez.	35
2.4. In vivo-Markierung von Drosophila melanogaster Fliegen	35
3. 81-O4 Zellkultur und -markierung	
3.1. Langzeitmarkierungen	37
3.2. Tunicamycin-/Monensinexperimente	37
3.3. Puls-Chase-Experimente	37
3.4. Kurzzeitmarkierung mit (³⁵ S)Sulfat	38
3.5. 20°C-Block	39

4.	M31-Zellkultur	
4.1.	Langzeitmarkierungen	39
4.2.	Tunicamycinexperimente	40
5.	PC12-Zellkultur	40
6.	Proteinreinigungen	
6.1.	Immunoaffinitätsreinigung von Immunoglobulin M	40
6.2.	Affinitätsreinigung von Immunoglobulin G2a	41
6.3.	Reinigung von Dotterprotein 2 aus adulten Drosophilafliegen	41
6.3.1.	Koreinigung von Dotterprotein 1, 2 und 3	41
6.3.2.	Reinigung von Dotterprotein 2	43
6.4.	Antigenaffinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern gegen die Dotterproteine 1, 2 und 3	43
6.5.	Anreicherung von Secretogranin I und II aus PC12-Zellen	44
7.	Proteinanalytische Methoden	
7.1.	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D SDS-PAGE)	44
7.2.	Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D SDS-PAGE)	44
7.3.	Proteintransfer auf Nitrocellulosefilter und Immunomarkierung	45
7.4.	Subklassenbestimmung von Immunoglobulin G	45
7.5.	Analytischer Papainverdau von Immunoglobulin G	46
7.6.	Neuraminidasebehandlung	46
7.7.	Endo H-Behandlung	46
7.8.	Ricinbindungstest	47
8.	Analysen von Sulfoproteinen	
8.1.	Alkalische Hydrolyse	47
8.2.	Pronaseverdau	47
8.3.	Ein- und zweidimensionale Dünnschichtelektrophoresen	48
8.4.	Bestimmung der Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung in Proteinen	48
9.	Analyse von Sulfopeptiden	
9.1.	Elution von Sulfopeptiden aus Gelstücken durch Trypsin	48
9.2.	Anreicherung von Sulfopeptiden durch C ₁₈ -Chromatographie	48
9.3.	HPLC-Trennung von Sulfopeptiden	48
9.4.	N-terminale Sequenzierung von Sulfopeptiden	50
9.5.	Aminosäureanalysen	50
9.6.	Chymotryptischer Subverdau von Sulfopeptiden	50
9.7.	Sulfopeptidkartierung	50
10.	In vitro-Sulfatierung von Immunoglobulin M	51
11.	Synthesen	
11.1.	Synthese von Tyrosin-(³⁵ S)sulfat	52
11.2.	Synthese von (³ H)Tyrosinsulfat und (¹⁴ C)Tyrosinsulfat	52

12.	Versuche mit Sulfatierungshemmern	
12.1.	Applikation von Sulfatierungshemmern	53
12.2.	Test auf Hemmung der (^{35}S)Sulfatinkorporation	53
12.3.	Bestimmung von (^{35}S)APS und (^{35}S)PAPS aus Zellen	53
13.	Immunisierung	54
14.	Flüssigkeitsszintillationszählungen	
14.1.	Radioaktivitätsbestimmung in Gelbanden	54
14.2.	Radioaktivitätsbestimmung in Celluloseplatten	55
14.3.	Zählung von ^{35}S - und ^3H -doppeltmarkierten Proben	55
14.4.	Fluorographie von Gelen	55

K A P I T E L 1

56-74

DAS VORKOMMEN DER TYROSINSULFATIERUNG VON PROTEINEN
IN VERSCHIEDENEN SPEZIES

EINFÜHRUNG	56
ZUSAMMENFASSUNG	58
ERGEBNISSE	
1.1. In Hefezellen ist nach Markierung mit (^{35}S)Sulfat kein Tyrosin(^{35}S)sulfat nachweisbar.	60
1.2. In Paramaeciumzellen ist nach Markierung mit (^{35}S)Sulfat kein Tyrosin(^{35}S)sulfat nachweisbar.	62
1.3. Tyrosinsulfatierung ist eine häufige Modifikation in dem Mollusken Arion spez.	64
1.4. Tyrosinsulfatierung ist eine häufige Modifikation in Drosophila melanogaster.	67
DISKUSSION	
1.1. Sulfatmarkierung in sulfatreduzierenden Organismen	70
1.2. Das Auftreten der Tyrosinsulfatierung in der Evolution	72

K A P I T E L 2

74-124

DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER TYROSINSULFATIERUNG VON PROTEINEN

EINFÜHRUNG	75
ZUSAMMENFASSUNG	79
ERGEBNISSE	
2.1. Die Schwere Kette des Immunglobulins M von 81-04 Zellen inkorporiert (^{35}S)Sulfat.	82
2.2. 66% des Sulfates in der Schwere Kette ist an Tyrosinresten gebunden.	85
2.3. 34% des Sulfates in der Schwere Kette kommen in N-gebundenen Oligosacchariden vor.	88

2.4.	Die Schwere Kette des IgM ist substöchiometrisch sulfatiert.	89
2.5.	Von den intrazellulären Formen der Schwere Kette des IgM sind nur die terminal glykosylierten Formen sulfatiert.	91
2.6.	Die Sulfatierung und die Sekretion von IgM werden durch Monensin gehemmt.	95
2.7.	Mit (^{35}S)Sulfat pulsmarkierte intrazelluläre Schwere Kette des IgM enthält bereits zwei trans Golgi-spezifische Modifikationen.	97
2.8.	Die in vitro sulfatierte Schwere Kette des IgM enthält bereits trans Golgi-spezifische Modifikationen.	100
2.9.	Mit (^3H)Galaktose und (^{35}S)Sulfat-pulsmarkiertes IgM werden mit identischen Raten sekretiert.	103
	Die Sulfatierung der Schwere Kette ist irreversibel.	103
2.10.	Die Sekretion von (^{35}S)Sulfat-markiertem IgM wird bei 20°C verhindert.	110
2.11.	Sialinsäure in der Schwere Kette des IgM beeinflusst den Grad der Sulfatierung der Schwere Kette.	112

DISKUSSION

2.1.	Die Tyrosinsulfatierung der Schwere Kette des IgM	116
2.2.	Die Sulfatierung an Kohlenhydratresten der Schwere Kette des IgM	118
2.3.	Die subzelluläre Lokalisierung der Sulfatierung der Schwere Kette des IgM	119
2.4.	Tyrosinsulfatierung im trans Golgi Netzwerk	121
2.5.	Die Transportkinetik von pulsmarkiertem IgM	123

K A P I T E L 3

DIE KONSENSUSSTRUKTUR DER TYROSINSULFATIERUNG

125-143

EINFÜHRUNG

125

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1.	Ableitung einer Konsensusstruktur der Tyrosinsulfatierung	128
3.1.1.	Hydrophile Domänen	131
3.1.2.	Saure Aminosäuren	131
3.1.3.	Die An- oder Abwesenheit anderer Aminosäuren	132
3.1.4.	Die Abwesenheit von Disulfidbrücken	133
3.1.5.	Die Abwesenheit von N-Glykosylierungsstellen	133
3.1.6.	Die Anwesenheit von "turn"-inuzierenden Aminosäuren	134
3.2.	Zusammenfassung der Beobachtungen zu einer Konsensusstruktur	136
3.3.	Anwendung der Konsensusstruktur	139

DER EINFLUSS DER N-GLYKOSYLIERUNG AUF DIE TYROSINSULFATIERUNG VON PROTEINEN

EINFÜHRUNG	144
ZUSAMMENFASSUNG	146
ERGEBNISSE	
4.1. Die Schwere Kette eines Hybridoma Immunoglobulin G2a ist sulfatiert.	147
4.2. Die Schwere Kette des IgG2a ist auch nach Tunicamycinbehandlung der Zellkulturen sulfatiert.	149
4.3. Unter Kontrollbedingungen ist die Schwere Kette an Kohlenhydratresten sulfatiert, unter Tunicamycinbedingungen an Tyrosinresten.	151
4.4. Die Kohlenhydratsulfatierung des IgG2a ist im F_{ab} -Teil der Schwere Kette lokalisiert, die Tyrosinsulfatierung im F_c -Teil.	153
4.5. Die Tyrosinsulfatierung von IgG2a nach Tunicamycinbehandlung ist substöchiometrisch.	155
DISKUSSION	158

DIE DOTTERPROTEINE VON DROSOPHILA MELANOGASTER ALS MODELLPROTEINE ZUM
STUDIUM DER TYROSINSULFATIERUNG VON PROTEINEN

EINFÜHRUNG	160
ZUSAMMENFASSUNG	164
ERGEBNISSE	
5.1. Drosophila Fliegen haben tyrosinsulfatierte Polypeptide, die geschlechtsspezifisch vorkommen.	166
5.2. Identifizierung der weibchenspezifischen, tyrosinsulfatierten Proteine als Dotterproteine 1, 2 und 3.	168
5.3. Alle isoelektrischen Varianten der Dotterproteine sind sulfatiert. Die Dotterproteine sind unterschiedlich stark sulfatiert.	171
5.4. Die Dotterproteine 1, 2 und 3 sind ausschließlich an Tyrosinresten sulfatiert	173
5.5. Dotterproteine 1, 2 und 3 sind stöchiometrisch an Tyrosinresten sulfatiert.	175
5.6. Die Dotterproteine 1, 2 und 3 haben unterschiedliche Sulfopeptidmuster.	177
DISKUSSION	180

DIE IDENTIFIZIERUNG DER TYROSINSULFATIERUNGSSTELLE IN DOTTERPROTEIN 2

EINFÜHRUNG	183
ZUSAMMENFASSUNG	185
ERGEBNISSE	
6.1. Reinigung von Dotterprotein 2 aus Fliegen von Drosophila melanogaster	186
6.2. Nahezu alle ^{35}S Radioaktivität von Dotterprotein 2 kann in zwei tryptischen Sulfopeptiden isoliert werden.	193
6.3. Die zwei tryptischen Sulfopeptide haben gleiche N-Termini, die der Sequenzposition 162 von Dotterprotein 2 entsprechen und enthalten je drei Tyrosinreste.	199

6.4. Nur der Tyrosinrest 172 in den beiden Sulfopeptiden A und B ist sulfatiert.	205
--	-----

DISKUSSION

6.1. Reinigung der Dotterproteine	210
6.2. Identifizierung der Tyrosinsulfatierungsstelle in Dotterprotein 2	211
6.3. Expression von Dotterprotein 2 in L-Zellen der Maus	214
6.4. Gerichtete Mutagenese von Dotterprotein 2	214

K A P I T E L 7

216-252

CHLORAT - EIN INHIBITOR DER TYROSINSULFATIERUNG IN INTAKTEN ZELLEN

EINFÜHRUNG	216
------------	-----

ZUSAMMENFASSUNG	220
-----------------	-----

ERGEBNISSE

7.1. Sulfatanaloge Anionen blockieren in vivo die Inkorporation von (^{35}S)Sulfat in Proteine von Hybridomazellen.	223
7.2. Chlorat ist von geringer Toxizität.	227
7.3. Chlorat selbst hat keine desulfatierende Aktivität.	229
7.4. Chlorat senkt das Verhältnis von (^3H)Tyrosinsulfat zu (^3H)Tyrosin in den Secretograninen I und II.	229
7.5. Die Konzentrationen von Methionin und Cystein im Medium beeinflussen den Einbau von radioaktivem Sulfat in Proteine.	233
7.6. Eine Verringerung von Cystein und Methionin im Medium potenziert den hemmenden Effekt von Chlorat auf die Proteinsulfatierung.	237
7.7. Quantifizierung des hemmenden Effektes von Chlorat auf die Tyrosinsulfatierung von Sekretogranin I und II unter normalen und reduzierten Konzentrationen von Methionin und Cystein.	239
7.8. Chlorat die Bildung von (^{35}S)APS und (^{35}S)PAPS in intakten Zellen.	242

DISKUSSION

7.1. Mögliche Artefakte	245
7.2. Chlorat führt zu einer echten Hemmung der Proteinsulfatierung	247
7.3. Die Wirkungsweise von Chlorat in intakten Zellen	248
7.4. Die Effekte von Chlorat in intakten Zellen und in vivo	250
7.5. Die Anwendung von Chlorat	251

A N H A N G

253-270

PRÄPARATION VON POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN DIE DOTTERPROTEINE 1, 2 UND 3

A.1. Präparation des Antigens

253

A.2. Test der Antiseren und affinitätsgereinigten Antikörper

255

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

258-270

A B K Ü R Z U N G S V E R Z E I C H N I S S

Abb	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Adenosin-5'-phosphosulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Becquerel
CCK	Cholecystokinin
CHO	Kohlenhydratreste
cpm	gezählte Zerfallsereignisse pro Minute
2D	zweidimensional
Da	Dalton
DCNP	Dichlornitrophenol
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	Dotterprotein von Drosophila melanogaster
EDTA	Ethylendinitrioloessigsäure Dinatriumsalz
EM	Elektronenmikroskop
Endo H	Endo- β -N-acetylglukosaminidase H
F _{ab}	Antigen-bindendes Fragment von Immunoglobulin G
F _c	Kristallisierbares Fragment von Immunoglobulin G
FCS	Fötales Kälberserum
Fuc	Fukose
Gal	Galaktose
HC	Schwere Kette des Immunoglobulin G (heavy chain)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

HPLC	Hochdruckflüssigphasenchromatographie
ID ₅₀	Dosis bei der 50% Hemmung eintritt
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunoglobulin G (Gamma)
IgG2a	Mäuse-IgG vom Subtyp 2a
IgM	Immunoglobulin M (μ)
kDa	Kilodalton
KSA	Kaninchenserumalbumin
LC	Leichte Kette der Immunoglobuline (light chain)
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50% der Testtiere stirbt.
M	Molar
M31	Bezeichnung für eine Hybridomazelllinie
Man	Mannose
ml	Milliliter
NEPHGE	Non-equilibrium-pH-gradient-gelelectrophoresis
nm	nanometer
81-04	Bezeichnung für eine Hybridomazelllinie
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphat
PAPS	3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat
PBS	Phosphatgepufferte Saline
PCP	Pentachlorphenol
PIPES	Piperazin-1,4-diethan-sulfonsäure
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
r	Regressionskoeffizient
rER	Rauhes Endoplasmatisches Reticulum
RNA	Ribonukleinsäure
S	Svedberg-Einheit

SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser(S)	Serin O-sulfat
Tab	Tabelle
Thr(S)	Threonin O-sulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tyr(S)	Tyrosin O-sulfat
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

Z U S A M M E N F A S S U N G

In eukaryontischen Zellen werden bei vielen Proteinen nach der Synthese die Seitengruppen der Aminosäuren kovalent durch spezifische Enzyme modifiziert. An vielen Beispielen ist gezeigt worden, daß kovalente Proteinmodifikationen wichtige biologische Funktionen erfüllen, z.B. bei der Regulation von Enzymaktivitäten oder als Strukturelemente. Wenig erforscht ist die Sulfatierung von Proteinen an Tyrosinresten, da sie jahrzehntelang für eine sehr seltene Modifikation gehalten wurde. Kürzlich erhielt diese Modifikation jedoch zunehmende Beachtung, da gefunden wurde, daß offensichtlich eine große Zahl von Proteinen an Tyrosinresten sulfatiert vorkommen und die modifizierten Proteine fast ausschließlich sekretorische Proteine sind. Sulfatierung stellt wahrscheinlich die häufigste kovalente Modifikation von Tyrosinresten in Proteinen dar. Die vorgelegte Arbeit untersucht bisher unerforschte Aspekte der Enzymologie und Zellbiologie der Tyrosinsulfatierung und beschreibt zwei verschiedene methodische Ansätze zur Untersuchung biologischer Funktionen dieser Modifikation.

Die Untersuchung verschiedener einzelliger und mehrzelliger Spezies ergab, daß in der Evolution der Lebewesen die Tyrosinsulfatierung offenbar nur in eukaryontischen, vielzelligen Organismen vorkommt. Nahezu ausschließlich sekretorische Proteine werden an Tyrosinresten sulfatiert gefunden, was zu der Annahme führte, daß die

Tyrosinsulfatierung bei der Proteinsekretion eine Rolle spielt. Es wurde daher untersucht in welchem der subzellulären Kompartimente, die von sekretorischen Proteinen auf ihrem Weg aus der Zelle passiert werden, die Tyrosinsulfatierung stattfindet. Die Beobachtung, daß sekretorisches Immunglobulin M (IgM) in der Schwere Kette an Tyrosin sulfatiert war, ermöglichte es, diese Frage in IgM-sekretierenden Hybridomazellen zu untersuchen. Durch die Analyse der Kohlenhydratmodifikationen intrazellulärer, sulfatmarkierter IgM-Spezies, durch Pulsmarkierungsversuche, in vitro Sulfatierungsexperimente und durch spezifische Blockaden des intrazellulären Transportweges konnte gezeigt werden, daß die Tyrosinsulfatierung ausschließlich im trans Golgi Kompartiment stattfindet und wahrscheinlich die letzte Modifikation an der Schwere Kette ist, bevor IgM die Zelle verlässt.

Beim Vergleich aller bisher identifizierten Tyrosinsulfatierungsstellen in Proteinen wurde festgestellt, daß Proteine mit Tyrosinresten in der Sequenz -Asp/Glu-Tyr- die bevorzugten Substrate der Tyrosylprotein Sulfotransferase sind. Zusätzlich weist die Umgebung, in der diese Konsensussequenz vorkommt, noch weitere strukturelle Besonderheiten auf, z.B. viele Aminosäuren mit sauren Seitengruppen, "turn"-induzierende Aminosäuren sowie die Abwesenheit von kovalenten Modifikationen wie Disulfidbrücken und N-gebundenen Oligosacchariden. Mit diesen zu einer Konsensusstruktur zusammengefassten

Merkmale wurden in einer Proteinsequenzdatenbank durch Computeranalyse potentielle Proteinsubstrate der Tyrosinsulfatierung gefunden. Ebenso wurden Tyrosinsulfatierungsstellen in bereits identifizierten tyrosinsulfatierten Proteinen vorgeschlagen. Ob die Anwesenheit eines Oligosaccharides in der Nähe eines potentiell sulfatierbaren Tyrosinrestes dessen Sulfatierung blockiert, wurde in einer Immunglobulin G2a sekretierenden Hybridomazelllinie untersucht. In der Schweren Kette von IgG2a ist ein potentiell sulfatierbarer Tyrosinrest einem N-glykosylierten Asparagin benachbart. Das IgG2a, das unter Kontrollbedingungen nur an Kohlenhydratresten sulfatiert war, wurde in der Abwesenheit von N-gebundenen Oligosacchariden tatsächlich de novo an Tyrosinresten sulfatiert.

Um die Funktionen der Tyrosinsulfatierung zu untersuchen, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt: ein gentechnologischer und ein pharmakologischer. Bei dem gentechnologischen Ansatz sollte das Gen eines Modellproteins so mutiert werden, daß es nach Expression nicht mehr an Tyrosin sulfatierbar ist. Dotterprotein 2 von *Drosophila melanogaster* wurde als das geeignetste Protein ausgewählt, da es stöchiometrisch und ausschließlich an Tyrosin mit 1 Mol/Mol sulfatiert wird und bereits kloniert und sequenziert ist. Um festzustellen, welcher der 17 Tyrosinreste sulfatiert ist, wurde Dotterprotein 2 aus *Drosophila melanogaster* Fliegen gereinigt. Tryptische und

chymotryptische Sulfopeptide von Dotterprotein 2 wurden durch HPLC aufgetrennt und ihre Sequenzpositionen durch N-terminale Sequenzierung und Aminosäureanalyse identifiziert. Diese Analysen ergaben, daß Tyrosin 172 der einzige sulfatierte Tyrosinrest in Dotterprotein 2 (Vorläuferprotein) ist. Meine Kollegin Dr. Friederich, die die heterologe Expression des Proteins in L-Zellen der Maus und die gerichtete Mutagenese des sulfatierbaren Tyrosins zu Phenylalanin durchführte, konnte zeigen, daß das an Tyrosin 172 mutierte Protein in intakten Zellen nicht mehr sulfatiert wird.

Um die Funktionen der Tyrosinsulfatierung auch in weniger gut charakterisierten Proteinen durch weniger aufwendige Methoden zu studieren, wurde nach einem Inhibitor der Tyrosinsulfatierung gesucht. Chlorat, ein in vitro Inhibitor der ATP-Sulfurylasereaktion, erwies sich auch in intakten Zellen als Inhibitor der Synthese des Kosubstrates der Sulfatierung (3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat). Die Chloratbehandlung rief keine cytopathischen Effekte hervor und führte zu einer nahezu vollständigen Hemmung der Tyrosinsulfatierung. In Zellkulturen können nun verschiedene funktionelle Aspekte der Tyrosinsulfatierung untersucht werden, z.B. mögliche Funktionen der Modifikation während des intrazellulären Transportes der modifizierten Proteine, sowie Funktionen der Modifikation nach der Sekretion der modifizierten Proteine.

E I N L E I T U N G

1. Kovalente, post-translationale Modifikationen von Aminosäureresten in Proteinen

In allen bekannten Lebewesen werden Proteinsequenzen in der DNA durch eine Abfolge von Basentripletts kodiert. Die 64 möglichen Basentripletts kodieren für maximal 20 verschiedene Aminosäuren in einem Protein. Die 20 Aminosäuren unterscheiden sich durch ihre Seitengruppen, die ihnen besondere chemische Eigenschaften verleihen. Die DNA-Sequenz eines Genes legt somit letztlich fest, welche chemische Eigenschaft ein Protein an einer bestimmten Stelle in seiner Aminosäuresequenz hat. Da der Aminosäurerest im Protein Teil einer polymeren Struktur ist, kann er die Eigenschaften des gesamten Polymers beeinflussen. Selbst bei großen Proteinen können Austausch einzelner Aminosäuren drastische Auswirkungen auf die Struktur und damit die Funktion des gesamten Proteins haben. Hier sind zwei Beispiele angeführt: Der Austausch eines Glutamatrestes gegen einen Valinrest im Hämoglobin führt dazu, daß Hämoglobinmoleküle aggregieren (Ingram, 1957). Dies ist die molekulare Ursache für die Sichelzellanämie, bei der abnorm geformte Rote Blutkörperchen auftreten. Der Austausch eines Glycinrestes gegen nahezu jede beliebige andere Aminosäure in einem "ras" genannten Regulatorprotein des Menschen führt dazu, daß eine normale Zelle zu einer Krebszelle entartet

(Tabin et al., 1982; Reddy et al., 1982).

In der Natur werden die Eigenschaften eines Proteins nicht nur zufällig auf Ebene der DNA durch Mutationen verändert, sondern auch gezielt nach der Synthese des Proteins. Eine Vielzahl von Enzymen ist darauf spezialisiert, Aminosäurereste in Proteinen mit Hilfe eines energiereichen Kosubstrates kovalent zu modifizieren (siehe Tabelle E1). Durch solche Reaktionen kann die chemische Eigenschaft, die im Gen für eine bestimmte Stelle im Protein vorgesehen ist, drastisch verändert werden, analog einem Aminosäureaustausch (vergleiche Abb.E1). Ungeladene Aminosäuren können zu geladenen (vgl. Proteinphosphorylierung; A), hydrophobe Aminosäuren zu hydrophilen, geladenen (vgl. Tyrosinsulfatierung; F) werden, hydrophile Aminosäuren können stark hydrophob werden (vgl. Proteinacylierung; E), geladene Aminosäuren können ungeladen werden (vgl. Proteinmethylierung; C) oder basische Aminosäuren können zu sauren Aminosäuren werden (vgl. ADP-Ribosylierung; D). Alle diese Reaktionen stellen demzufolge eine grundsätzliche Umdeutung der Information dar, die in dem Gen des jeweiligen Proteins für einen bestimmten Aminosäurerest kodiert war.

Für eine solche Umdeutung der primären genetischen Information bedarf es einer Fülle zusätzlicher (sekundärer) genetischer Information in der Zelle. Erstens bedarf es genetischer Informationen zur Kodierung und Regulation der modifizierenden Enzyme. Diese Enzyme sind spezifisch und modifizieren nur ausgesuchte Aminosäurereste in einem

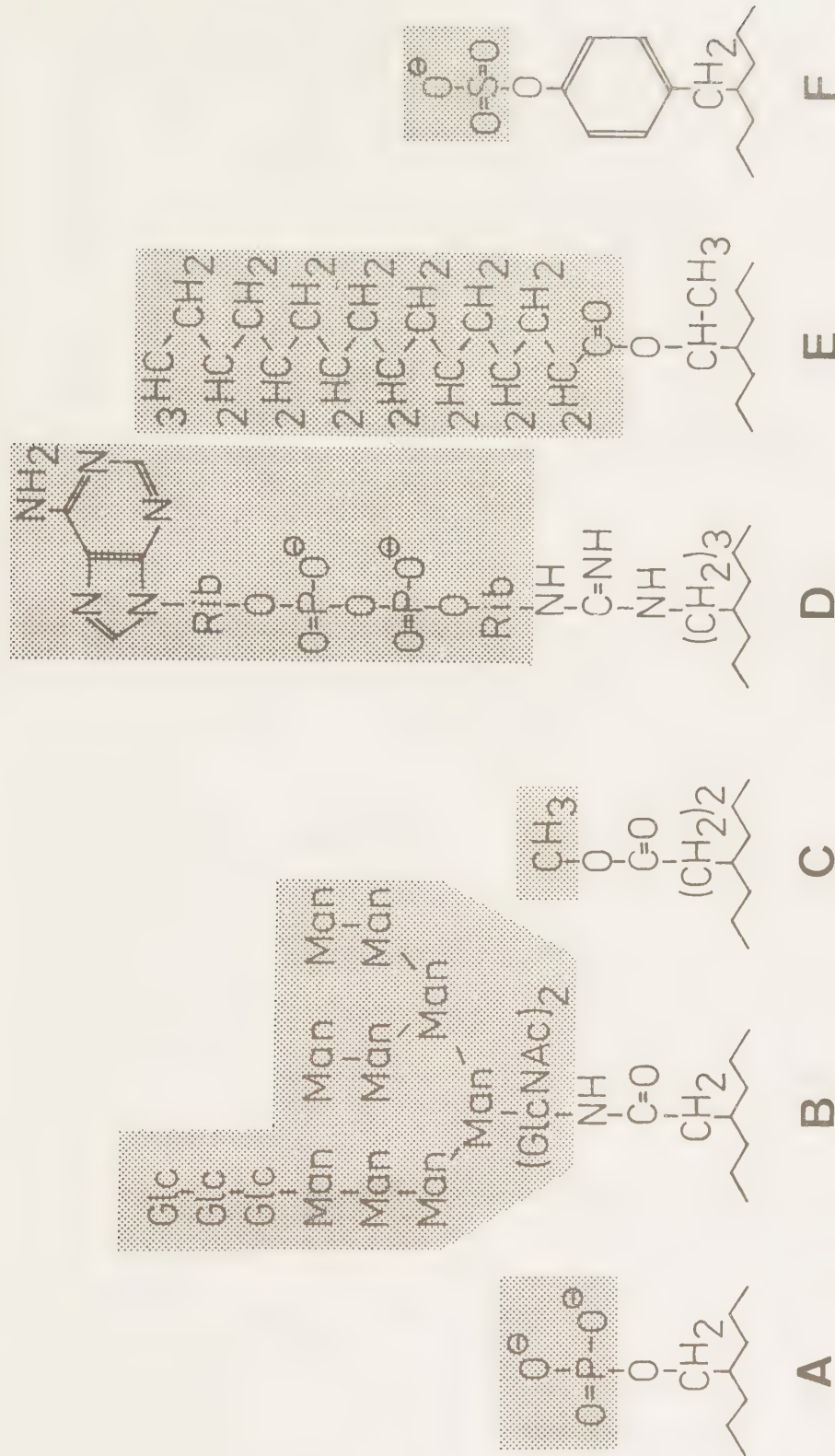


Abb.E1.: Weitverbreitete kovalente Modifikationen von Aminosäureresten in Proteinen. Gezeigt sind von links nach rechts (A) die Phosphorylierung eines Serinrestes, (B) die N-Glykosylierung eines Asparaginrestes, (C) die Methylierung eines Glutamatrestes, (D) die ADP-Ribosylierung eines Argininrestes, (E) die Acylierung eines Threoninrestes und (F) die Sulfatierung eines Tyrosinrestes. Die grau unterlegte Fläche zeigt jeweils die Molekülstruktur der übertragenden Gruppe. Die Zick-zacklinie stellt einen Ausschnitt aus der Polypeptidkette dar. Glc: Glukose; Man: Mannose; GlcNAc: N-Acetyl-Glukosamin; Rib: Ribose. Literaturhinweise siehe Tabelle E1.

Protein, die meist durch benachbarte Aminosäurereste im Protein determiniert werden. Zweitens bedarf es genetischer Information im Substratprotein, um eine Modifizierungsstelle zu bilden. Drittens bedarf es genetischer Information, um Substratprotein und modifizierendes Enzym in einer Zelle zusammentreffen zu lassen, d.h. Enzym und Substratprotein müssen Signale haben, die sie in das gleiche subzelluläre Kompartiment dirigieren. Viertens bedarf es genetischer Informationen zur Kodierung und Regulation der Enzyme und anderer Proteine, die das Kosubstrat synthetisieren bzw. zum Ort der Reaktion transportieren. Die gezielte, post-translationale Veränderung von Aminosäureresten durch kovalente, enzymatische Modifizierung bedarf demnach einer Vielzahl von zusätzlichen Genprodukten.

Werden Proteine durch alkalische oder saure Hydrolyse analysiert, finden sich in den Hydrolysaten in der Regel die 20 primären Aminosäuren für die transfer-RNAs existieren. Durch sehr schonende Hydrolyse mit proteolytischen Enzymen können weitaus mehr Aminosäuren gefunden werden, die säure- oder alkalilabil sind, und aus Aminosäuremodifikationsreaktionen hervorgegangen sind. Bis heute sind mehr als 140 Aminosäuremodifikationen in Proteinen bekannt geworden, von denen viele enzymatisch mit Hilfe energiereicher Kosubstrate, meist Nukleotide, synthetisiert werden (siehe Uy and Wold, 1977; Wold, 1981; Alix und Hayes, 1983; Tab.E1). Einige der weitverbreiteten, enzymatisch katalysierten Modifikationen von

Modifikation	Phosphorylierung	N-Glykosylierung	O-Glykosylierung	Methylierung	ADP-Ribosylierung	Acylierung	Sulfatierung
modifizierte Aminosäure	Ser, Thr, Tyr	Asn	Ser, Thr	Glu, Lys, Arg	Arg, Lys, Ser, Asn, isoAsp	Ser, Thr, Cys, Tyr	
Enzyme	Proteinkinasen	Oligosaccharyltransferase	O-Glykosyltransferasen	Protein - methylasen	ADP-ribosyltransferasen	Acyl - transferasen	Tyrosylprotein-sulfotransferase
energiereiches Kosubstrat	Adenosintriphosphat (ATP)	Dolicholphosphat-oligosaccharid	Nucleotidmono- oder diphosphat-monosaccharide	S-Adenosyl-methionin (SAM)	Nicotinamid-adenindinukleotid (NAD)	Palmitoyl-, Myristoyl-Koenzym A	3'-Phosphoadenosin 5'-phosphosulfat (PAPS)
Lokalisation der Enzyme	Cytosol, Nukleus, Mitochondrien, Golgi Apparat	rauhes endoplasmatisches Retikulum	Golgi Apparat, ER	Cytosol, Nukleus	Cytosol, Nukleus, Mitochondrien	rauhes endoplasmatisches Retikulum, Cytosol	trans Kompartiment der Golgi Apparat
Reversibilität	+/-	-	-	+	+	+/-	-
sekundär modifizierbare Modifikation	-	+	+	-	+	?	-
Literaturhinweise	Krebs und Bravo, 1979; Rosen und Krebs, 1982	Hubbard und Ivatt, 1981; Kornfeld und Kornfeld, 1985	Kornfeld und Kornfeld, 1980	Paik und Kim, 1980; Gagnon und Heisler, 1979; Clarke, 1985	Althaus et al., 1985; Gaal und Pearson, 1986	Schmidt, 1985; Magee and Courtneidge, 1985	Huttner et al., 1986; Huttner und Baeuerle, 1987

Tab. EL: Charakteristika verschiedener weifverbreiteter Proteinmodifikationen.

Aminosäureseitengruppen sind in Tab.E1 aufgeführt. Einzelne Proteine können mehrere verschiedenartige post-translationalale kovalente Modifizierungen erfahren. So wird z.B. das Rezeptorprotein für den Epidermalen Wachstumsfaktor an Asparaginresten glykosyliert sowie von verschiedenen Proteinkinasen an Threonin- und Tyrosinresten phosphoryliert (siehe Heldin und Westermark, 1984).

Wie in Tab.E1 für sieben Beispiele beschrieben ist, kommen post-translationalale Modifikationsreaktionen in den meisten Kompartimenten einer Zelle vor. Einzelne Modifikationen sind jedoch streng kompartmentalisiert. So wurde z.B. weder die N-Glykosylierung von Proteinen jemals in Proteinen des Cytosols, des Zellkerns oder der Mitochondrien beobachtet, noch wurde z.B. die ADP-Ribosylierung jemals in Proteinen beobachtet, die die Zelle durch Sekretion verlassen. Dies ist durch die subzelluläre Lokalisierung der modifizierenden Enzyme sowie in einigen Fällen durch die Verfügbarkeit des Kosubstrats bedingt.

In eukaryontischen Zellen ist sogar ein Organellesystem auf die kovalente Modifizierung von Proteinen spezialisiert. Dies sind das rauhe Endoplasmatische Retikulum (rER) und der Golgi Apparat. Proteine, die für das Zelläußere, die Plasmamembran, die Lysosomen (oder das Organellesystem selbst) bestimmt sind, werden in einer festgelegten Richtung durch das rER und die einzelnen Subkompartimente des Golgiapparates geschleust und dabei einer Sequenz von kovalenten Modifizierungsreaktionen unterworfen (siehe

Kornfeld und Kornfeld, 1985; Farquhar, 1985; Dunphy und Rothman, 1985; siehe Abb.2.1.). Die meisten dieser Modifizierungsreaktionen sind sekundäre Modifizierungen von an Asparaginresten gebundenen Oligosacchariden. Im rER und im Golgiapparat kommen aber auch zahlreiche Modifizierungen an primären Aminosäureresten vor, z.B. Acylierung, Phosphorylierung, Sulfatierung oder O-Glykosylierung (siehe Tab.E1).

Ein Hauptunterschied zwischen den Modifizierungsreaktionen, die ektoplasmatish z.B. an sekretorischen Proteinen stattfinden, und den cytoplasmatischen Modifizierungsreaktionen ist ihre Irreversibilität. Bis auf wenige Ausnahmen erreichen modifizierte Seitengruppen, die in rER und Golgi Apparat synthetisiert werden, dasselbe Alter wie das Protein, in dem sie vorkommen. Dies hat mehrere Gründe: Erstens kommen in dem Kompartiment, in das das Protein letztlich transportiert wird, keine enzymatische Aktivitäten vor, die die Modifizierung spezifisch entfernen. Zweitens kommen sekretorische Proteine während ihrer Biogenese nur ein einziges Mal durch das Kompartiment, in dem das modifizierende Enzym und das Kosubstrat spezifisch lokalisiert sind. Eine erneute Modifizierung nach erfolgter Demodifizierung ist deshalb nicht möglich.

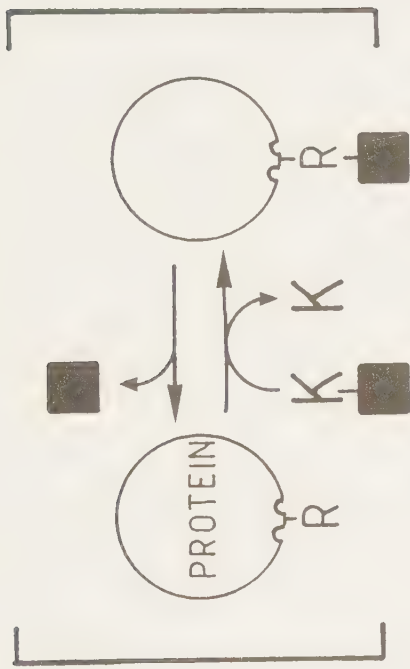
Im Gegensatz dazu sind die meisten cytoplasmatisch lokalisierten, kovalenten Modifizierungsreaktionen reversibel. Sehr gut untersucht ist die Proteinphosphorylierung, die hauptsächlich an Serin- und

Threoninresten stattfindet (siehe Tab.E1). Neben den Enzymen, die Phosphatgruppen von ATP auf die Hydroxyaminosäuren von Proteinen übertragen, den Proteinkinasen, existieren im gleichen Kompartiment Proteinphosphatasen, die spezifisch die Phosphatgruppen wieder entfernen. Das Kosubstrat ATP ist ständig in diesem Kompartiment verfügbar. Ein bestimmtes Protein kann somit während seiner Lebensdauer viele Male einen unterschiedlichen Modifizierungsstatus durchlaufen. Dies bildet die molekulare Grundlage für ein schnell ansprechendes Regulationssystem (Interkonversion)(siehe Abb.E2, oben; siehe Chock et al., 1980). Es wurde gefunden, daß Enzyme verschiedene Aktivitätszustände haben, je nachdem, ob sie phosphoryliert oder dephosphoryliert sind. Enzyme der Glykolyse werden z.B. durch Proteinkinasen und Proteinphosphatasen in ihrer Aktivität reguliert, wobei die Gleichgewichte zwischen modifizierten und nicht modifizierten Formen der Enzyme durch Effektoren der Proteinkinasen, z.B. zyklisches AMP oder wiederum durch Proteinphosphorylierung, reguliert werden (siehe Krebs, 1981; Rosen und Krebs, 1982).

Wird eine kovalente Modifizierung einer Aminosäureseitengruppe zum Gegenstand der Forschung gemacht, ist besonders die Beantwortung der folgenden Fragen wichtig, um die biologische Bedeutung der Modifikation zu verstehen.

1) Wie verbreitet ist die Modifikation?

reversibel



irreversibel

PROTEINSYNTHESE

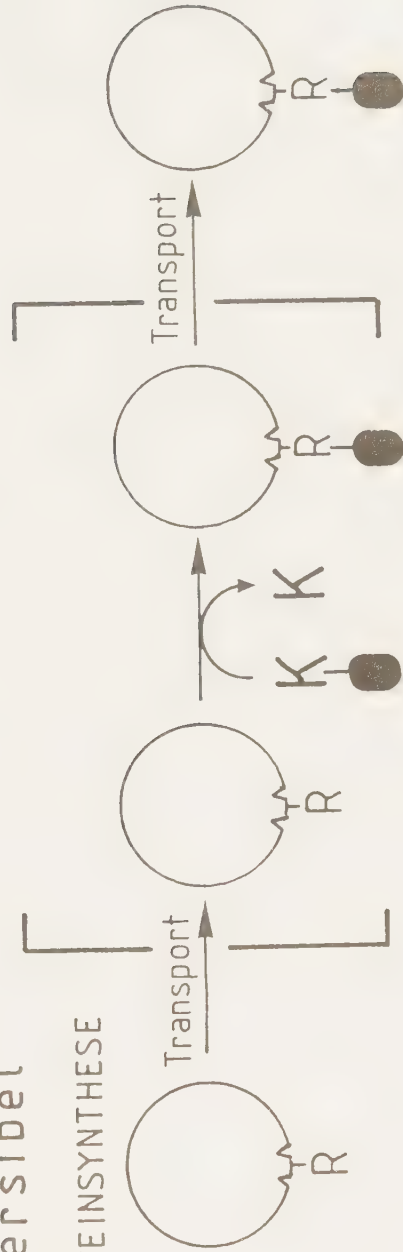


Abb. E2.: Vergleich einer reversiblen Proteinmodifikation, die im Cytoplasma stattfindet, mit einer irreversiblen Proteinmodifikation, wie sie im Golgiapparat abläuft.
R: Aminosäurerest im Protein; K: Kosubstrat der Modifizierung. Die eckige Klammer symbolisiert ein abgeschlossenes Kompartiment.

Viele der bekannten kovalenten Modifikationen kommen nur in wenigen Proteinen vor und erfüllen dort sehr spezielle Aufgaben. Beispielsweise kommt Cystein-S-Sulfonat offenbar nur in Thioredoxinen vor, wo es an der Sulfatreduktionsreaktion beteiligt ist (Tsang und Schiff, 1976). Andere Modifikationen hingegen, z.B. die N-Glykosylierung und die Phosphorylierung, kommen in sehr vielen verschiedenen Proteinen vor (siehe Tab.E1). Solche weit-verbreitete Modifikationen können oft die gleiche Funktion in verschiedenen Proteinen erfüllen. So hat z.B. die Sialylierung von N-gebundenen Oligosacchariden einen Einfluß auf die Lebensdauer von Glykoproteinen im Blutplasma (siehe Schauer, 1985). Proteinphosphorylierungen sind in vielen Fällen an der reversiblen Regulation von Enzymaktivitäten beteiligt (siehe Krebs, 1981).

2) Was haben Proteine mit derselben Modifikation gemeinsam?

Durch eine eingehendere Charakterisierung der modifizierten Proteine kann z.B. festgestellt werden, welcher topologischen Klasse diese Proteine angehören. Gehören die modifizierten Proteine einer einheitlichen topologischen Klasse an, ergibt sich z.B. ein erster Hinweis auf die subzelluläre Lokalisation des modifizierenden Enzyms.

3) Wo findet die Modifizierungsreaktion in der Zelle statt?

Die genaue Kenntnis der subzellulären Lokalisation des modifizierenden Enzyms kann für das Verständnis der biologischen Bedeutung der Modifikation von Bedeutung sein.

Es ist sehr wahrscheinlich, daß die Funktion der Modifizierung mit der Funktion des subzellulären Kompartiments, in der sie stattfindet, korreliert ist. Eine Modifikation, die in sekretorischen Kompartimenten vorkommt, kann z.B. für den Sekretionsvorgang selbst oder erst nach der Sekretion von Bedeutung sein.

4) Ist die Modifikation reversibel?

Ist die untersuchte Modifikation reversibel, kann sie an Regulationsvorgängen von Proteinaktivitäten beteiligt sein. Bei einer reversiblen Modifikation wird die Existenz eines demodifizierenden Enzymes und unter Umständen eine stetige Präsenz des Kosubstrates erwartet. Die prinzipiellen Unterschiede zwischen einer reversiblen und einer irreversiblen Modifikation sind in Abb.E2 gezeigt.

5) Welche enzymologischen Eigenschaften hat die Modifizierungsreaktion?

Unter diesen Punkt fällt z.B. die Frage nach der Natur des Kosubstrates, der Erkennungssequenz für das Enzym im Proteinsubstrat, den kinetischen Eigenschaften des Enzyms und seiner Regulation.

6) Was für eine biologische Funktion hat die kovalente Modifikation?

Diese Frage ist sicherlich am schwierigsten zu beantworten. Viele Modifikationen dienen nicht einer generellen Funktion, sondern erfüllen in jedem Protein, in dem sie vorkommen eine

ganz spezifische Funktion. Gentechnologische Methoden, bei denen Proteine so mutiert werden, daß sie nicht mehr modifizierbar sind oder pharmakologische Methoden, bei denen die Modifizierungsreaktion spezifisch gehemmt wird, würden es erlauben, diese Fragen im Detail zu untersuchen.

2. Kovalente Modifikationen an Tyrosinresten in Proteinen

Tyrosinreste sind chemisch sehr reaktiv. In der Natur kommen sowohl Modifikationen am aromatischen Ring wie auch an der phenolischen Hydroxylgruppe vor. Die wohl bekanntesten Ringsubstitutionen an Tyrosinresten sind 3-Jodo- und 3,5-Dijodotyrosin, die als Zwischenstufen bei der Synthese der Schilddrüsenhormone (Thyroxine) in dem Protein Thyreoglobulin auftreten (Wolff und Covelli, 1969).

Zahlreicher sind die Modifikationen, die an der phenolischen Hydroxylgruppe auftreten. So findet man z.B., daß die RNA des Poliovirus kovalent über einen Phosphodiester an einen Tyrosinrest eines viruskodierten Proteins gebunden ist (siehe Wimmer, 1982). In der Topoisomerase von *Escherichia coli* und der DNA-Gyrase von *Micrococcus luteus* wird ebenfalls DNA intermediär auf diesselbe Weise an Tyrosinreste der Enzyme gekoppelt (Tse et al., 1980). In gram-negativen Bakterien wird die Glutaminsynthase durch Adenylylierung von Tyrosinresten interkonvertiert (Shapiro und Stadtman, 1975). Eine sehr seltene, aber dennoch sehr bedeutungsvolle reversible Modifizierung von Tyrosinresten in Proteinen ist die Veresterung der Hydroxylgruppe mit einem Phosphorsäurerest (siehe Hunter, 1982). Dieser Tyrosinphosphorylierung von Proteinen kommt eine besondere Bedeutung bei der malignen Transformation und der Wachstumsregulation von Zellen zu (siehe Cooper und Hunter, 1983; Hunter und Cooper, 1985). Es wurde gefunden, daß der

molekulare Mechanismus, mit dem eine Vielzahl krebserzeugender Viren normale Zellen in Krebszellen umwandeln, der Expression einer viruskodierten Proteinkinase bedarf. Im Gegensatz zu den meisten anderen zellulären Proteinkinasen phosphorylieren diese Kinasen spezifisch Tyrosinreste in Substratproteinen (Hunter und Sefton, 1980). Kurze Zeit später wurde entdeckt, daß ebenfalls bei physiologischen Vorgängen der Wachstumsregulation Tyrosinphosphorylierung involviert ist. Bindet der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) an ein spezifisches Proteinrezeptormolekül auf einer Zielzelle, so wird auf der cytoplasmatischen Seite des durch die Zellmembran hindurchreichenden Rezeptormoleküls eine intrinsische Proteinkinase aktiviert, die cytoplasmatische Substratproteine an Tyrosinresten phosphoryliert (Carpenter et al., 1979). Dieser Vorgang ist ein wesentliches Ereignis bei der Stimulation der Zellteilung nach Behandlung von Zellen mit EGF (Hunter und Cooper, 1981).

Wie Untersuchungen von Huttner (1982), Hille et al. (1984) und dem Autor (siehe Kapitel 1 und 5) gezeigt haben, ist die wohl häufigste kovalente Modifikation von Tyrosinresten die O-Sulfatierung (Struktur siehe Abb.E3).

2.1. Die Tyrosinsulfatierung von Proteinen

2.1.1. Vorkommen

Tyrosinsulfat wurde erstmals im Fibrinopeptid B des Rindes im Jahre 1954 von Bettelheim beschrieben. Bis heute ist es in einer Vielzahl von Vertebratenspezies im Fibrinopeptid B gefunden worden (siehe Tab.E2). Bevor im Jahre 1982 Huttner die weite Verbreitung der Modifikation erkannte, wurde Tyrosinsulfat über die Jahrzehnte nach seiner Entdeckung als eine seltene Modifikation betrachtet, die nur auf wenige Peptidhormone beschränkt schien (Cholecystokinin, Gastrin, Caerulein, Phyllokinin, Hirudin und Leucin-enkephalin (Literaturhinweise siehe Tab.E2)). Die Studien von Huttner (1982) und Hille et al. (1984) zeigten jedoch, daß nach in vivo-Markierung von Ratten mit radioaktivem Sulfat viele verschiedene an Tyrosin sulfatierte Polypeptide in allen untersuchten Geweben der Tiere vorkamen. Die größte Anzahl verschiedener tyrosinsulfatierter Proteine wurde im Serum beobachtet, das nahezu ausschließlich sekretorische Proteine enthält. Wie die Tabelle E2 zeigt, wurden in den letzten Jahren in zahlreichen bereits charakterisierten Proteinen Tyrosinsulfat nachgewiesen.

Im Urin von Säugetieren werden täglich Milligrammengen Tyrosinsulfat und dessen deaminierte Produkte ausgeschieden (beim Menschen z.B. 32-49 mg pro Tag) (Tallan et al., 1955; Hext et al., 1973). Da bisher keine enzymatische Aktivität gefunden wurde, die effizient freies Tyrosin sulfatiert (siehe Sekura und Jakoby, 1981), ist es möglich, daß die modifizierte Aminosäure im Urin aus dem Abbau von tyrosinsulfatierten Proteinen stammt. Wie Berechnungen

Protein	Spezies	Topologie	Art der Sekretion	Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung	Zusätzliche Anwesenheit von Sulfat an Kohlenhydratresten	Referenzen
Alpha-Fetoprotein	Mensch	sec	con, in	?	?	Liu et al., 1985
Alpha-2-Antitrypsin	Mensch	sec	con, in	1	?	Hortin et al., 1986
Alpha-2-Mikroglobulin	Ratte	sec	con, in	?	?	Hille et al., 1984
Caerulein	Frosch	sec	reg, ex	1	-	Anastasi et al., 1968b
Cholecystokinin	Mensch, Hund, Schwein	sec	reg, in	1	-	Mutt and Jorpes, 1968
C-terminales Peptid des Cholecystokinin-Vorläufers	Ratte, Schwein, Mensch	sec	reg, in	1-?	-	Adrian et al., 1986
Komplement C4 (α -Kette)	Maus	sec	con, in	3	-	Eng et al., 1986
Dermatan Sulfat (Core-Protein)	Mensch	sec	con, in	?	+	Karp, 1983; Hortin et al., 1986
Entactin/Vidogen	Maus	sec	con, in	?	-	Kresse et al., unpubl.
Faktor X	Kuh	sec	con, in	< 1	?	Paulsson et al., 1985
Fibrin	Mensch, Pferd	sec	con, in	2	?	Morita and Jackson, 1986
Fibrinogen (β -Kette)	viele Spezies	sec	con, in	1-2	?	Jevons, 1963
Fibrinogen (γ -Kette)	Ratte	sec	con, in	?	?	Bettelheim, 1954; see Dayhoff, 1972
Fibronectin	Ratte, Mensch, Hamster	sec	con, in	1	?	Hille et al., 1984
Gastrin	Hund, Schwein, Ratte, Mensch, Maus	sec	reg, in	0.5 - 1	-	Liu and Lipman, 1984; Paul and Hynes, 1984
Heparin Kofaktor II	Mensch	sec	con, in	2	?	Gregory et al., 1964; Andersen, 1984
Hirudin	Blutegel	sec	reg, ex	1	-	Hortin et al., unpubl.
Immunoglobulin A (α -Kette)	Maus	sec	con, in	> 0.1	+	Peterson et al., 1976
Immunoglobulin G2a (γ -Kette)	Maus	sec	con, in	> 0.02 ^a	+	Baeuerle + Huttner, unpubl.
Immunoglobulin M (μ -Kette)	Maus	sec	con, in	> 0.1	+	Baeuerle + Huttner, 1984
Leu-Enkephalin	Schaf, Maus, Ratte, Meerschweinchen	sec	reg, in	0.2	-	Baeuerle + Huttner, unpubl.
Phyllokinin	Frosch	sec	reg, ex	1	-	Unsworth et al., 1982
Prokollagen Typ III	Mensch	sec	con, in	?	-	Anastasi et al., 1966
Prokollagen Typ V	Hühnchen	sec	con, in	1	-	Jukkola et al., 1966
Secretogranin I	Ratte, Kuh	sec	reg, in	1-2	+	Fessler et al., 1986
Secretogranin II	Ratte, Kuh	sec	reg, in	1-2	+	Lee and Huttner, 1983; Rosa et al., 1985b
S-Protein/Vitronectin	Mensch	sec	con, in	?	+	Lee and Huttner, 1983; Rosa et al., 1985; Hille, Jenne, Stanley and Huttner, unpubl.
SG 70	Volvox carteri	sec	con, ex	?	+	Wenzl and Sumper, 1986
Thyreoglobulin	Ratte, Maus, Schwein	sec	con, in	3-4	+	Herzog, 1985
Dotterprotein 1	Fruchtfliege	sec	con, in	2	-	Baeuerle and Huttner, 1985
Dotterprotein 2	Fruchtfliege	sec	con, in	1	-	Baeuerle and Huttner, 1985
Dotterprotein 3	Fruchtfliege	sec	con, in	1	-	Baeuerle and Huttner, 1985

Tab.E2.: Liste gut untersuchter Proteine, die an Tyrosinresten sulfatiert gefunden wurden (Stand Juli 1986).
a: nur nach Tunicamycinbehandlung von Zellen, siehe Kapitel 3.

zeigten, kann das im Urin gefundene Tyrosinsulfat nur zu einem kleinen Teil mit dem Abbau von Fibrinogen und den Peptidhormonen erklärt werden (Segal und Mologne, 1958; Hext et al., 1973). Wenn alles Tyrosinsulfat, das im Urin gefunden wird, aus dem Abbau von tyrosinsulfatierten Proteinen stammt, muß angenommen werden, daß noch viele nicht identifizierte tyrosinsulfatierte Proteine existieren.

2.1.2. Gemeinsamkeiten der modifizierten Proteinsubstrate

Wie der Tab.E2 zu entnehmen ist, befinden sich unter den bisher identifizierten tyrosinsulfatierten Proteinen ausschließlich sekretorische Proteine. Diese sekretorischen Proteine werden auf sehr unterschiedliche Weise sekretiert. Einige tyrosinsulfatierte Proteine werden reguliert sekretiert, d.h. sie werden in sekretorischen Granula angehäuft und erst nach einem Stimulus freigesetzt (siehe Kelly, 1985). Andere tyrosinsulfatierte Proteine werden konstitutiv, d.h. kontinuierlich ohne eine Speicherphase freigesetzt. Die Tyrosinsulfatierung sekretorischer Proteine ist demnach nicht für einen besonderen Modus ihrer Sekretion spezifisch. An Tyrosin sulfatierte Proteine können sowohl in externem als auch internem Milieu gefunden werden (siehe Tab.E2).

Die gemeinsame Topologie der bisher identifizierten tyrosinsulfatierten Proteine deutet darauf hin, daß sich die

Modifizierung in einem der sekretorischen Kompartimente ereignet, durch die die sekretorischen Proteine während ihres intrazellulären Transportes geschleust werden (siehe Abb.2.1.). Dabei kann es sich um das rER, den Golgi Apparat oder um sekretorische Vesikel handeln. Da ebenfalls lysosomale und Plasmamembranproteine diese Kompartimente passieren, ist es erstaunlich, daß bisher noch keine Tyrosinsulfatierung in lysosomalen Proteinen (Hille und Huttner, unpubliziert) und erst in sehr wenigen membranintegrierten Proteinen gefunden wurde (Hille und Huttner, unpubliziert; Baenziger et al., 1986). Tyrosinsulfatierung könnte demnach vorwiegend in sekretorischen Proteinen vorkommen (Baeuerle und Huttner, 1984; Hille et al., 1985; Huttner und Baeuerle, 1986).

2.1.3. Subzelluläre Lokalisation der Tyrosinsulfatierung

Wie im vorhergehenden Absatz bereits erwähnt wird, kommt die Tyrosinsulfatierung mit großer Wahrscheinlichkeit in einem bestimmten oder in mehreren der sekretorischen Kompartimente vor. Kudryk et al. (1983) beobachteten, daß Fibrinogen, das aus dem rER isoliert wurde, noch nicht sulfatiert war. Lee und Huttner (1985) fanden, daß eine tyrosinsulfatierende Aktivität nach subzellulärer Fraktionierung von Nebennierenmarkgewebe in den gleichen Fraktionen wie Galaktosyltransferaseaktivität angereichert war. Galaktosyltransferase ist ein Golgi-spezifisches Enzym

(Bergeron et al., 1982). Diese Befunde legen nahe, daß Tyrosinsulfatierung im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Da sich der Golgi Apparat jedoch in Subkompartimente mit sehr unterschiedlichen Funktionen gliedert, ist durch diese Untersuchungen nicht bekannt, in welchem Subkompartiment die Tyrosinsulfatierung lokalisiert ist.

2.1.4. Irreversibilität der Tyrosinsulfatierung

Folgende Befunde sprechen dafür, daß die Tyrosinsulfatierung in vivo in sekretorischen Proteinen irreversibel ist:

(1) Bisher wurde noch keine Sulfataseaktivität beschrieben, die effizient Tyrosinsulfatreste in Polypeptiden oder freies Tyrosinsulfat (Dodgson et al., 1959) desulfatiert. Einige Arylsulfatasen aus Mollusken, in hohen Konzentrationen eingesetzt, vermögen jedoch kleine tyrosinsulfatierte Peptide in vitro zu desulfatieren (siehe z.B. Adrian et al., 1986; Hortin et al., 1986a).

(2) Blombäck et al. (1960) konnten zeigen, daß in vivo die Sulfatmarkierung im Fibrinogen die gleiche Halbwertszeit hat, wie verschiedene Aminosäuremarkierungen im Protein. Dies zeigt, daß die Sulfatgruppe in dem untersuchten Protein keinem eigenen Turnover unterliegt. Die Sulfatmarkierung im Fibrinopeptid B des Kaninchens konnte als Tyrosinsulfat und dessen deaminierte Metabolite im Urin der Versuchstiere wiedergefunden werden (Jones et al., 1963).

(3) In Zellysaten, die durch Behandlung von Zellen mit

nicht-ionischem Detergenz gewonnen wurden, werden (^{35}S)Sulfat-markierte tyrosinsulfatierte Proteine nicht desulfatiert (Huttner, unpublizierte Befunde). Diesem Befund zufolge scheint in der untersuchten Zelllinie keine desulfatierende Aktivität zu existieren.

2.1.5. Die Enzymologie der Tyrosinsulfatierung

Eine Tyrosinsulfatierungsaktivität *in vitro* wurde erstmals 1983 von Lee und Huttner beobachtet. Endogene Proteinsubstrate konnten *in vitro* mit 3'-Phosphoadenosin 5'-Phosphosulfat (PAPS) (siehe Lipmann, 1958; Struktur siehe Abb.E4) als Kosubstrat an Tyrosinresten sulfatiert werden. PAPS dient ubiquitär als Kosubstrat für alle bekannten Sulfatierungsreaktionen (siehe Farooqui, 1980). Das Enzym, bezeichnet als Tyrosylprotein Sulfotransferase, benötigt für seine Aktivität divalente Kationen. Eine weitere Charakterisierung der mit nicht-ionischem Detergenz solubilisierten enzymatischen Aktivität mit einem synthetischen Substrat (einem Polymer aus Tyrosin, Glutamat und Alanin) (Lee und Huttner, 1985) ergab, daß das Enzym mit seinem aktiven Zentrum in das Lumen von Golgivesikeln orientiert ist. Die apparente Michaeliskonstante des Enzymes für das Kosubstrat PAPS war $5\text{ }\mu\text{M}$ und die für das synthetische Substrat $0,3\text{ }\mu\text{M}$. Das pH-Optimum der *in vitro* Reaktion lag zwischen pH 6 und 6,5. Vargas et al. (1985) fanden ebenfalls ein leicht saures pH-Optimum von 5.8 bei

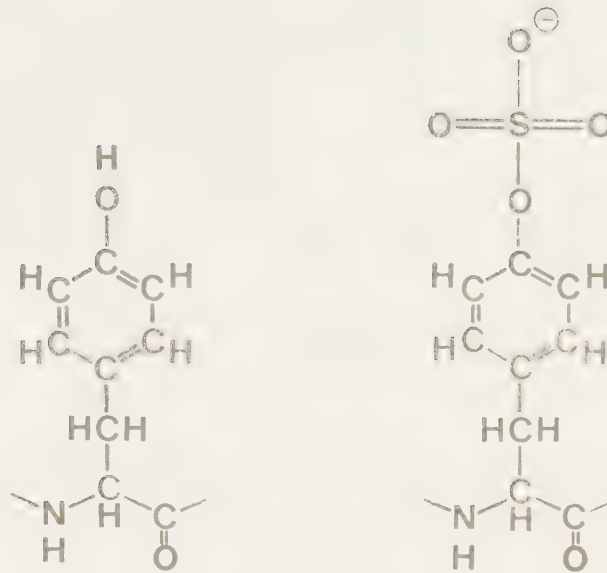


Abb.E3.: Die Molekülstruktur eines Tyrosinrestes vor und nach O-Sulfatierung.

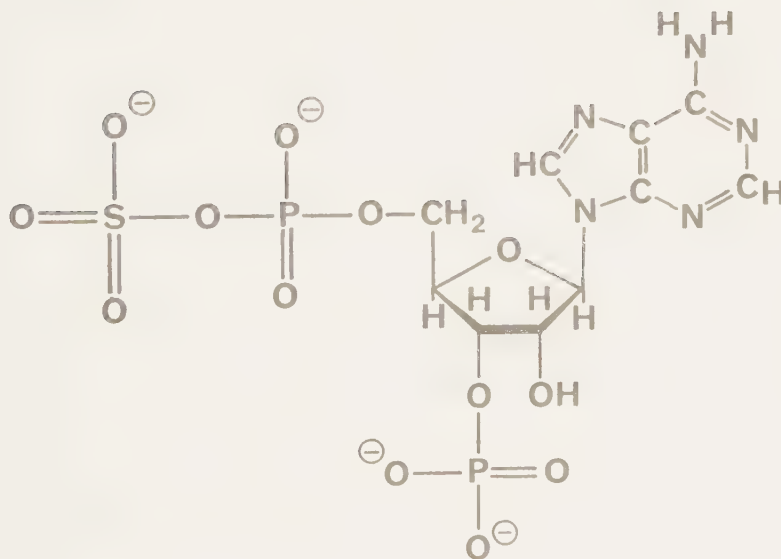


Abb.E4: Das ubiquitäre Kosubstrat von Sulfatierungsreaktionen, 3'-Phosphoadenosin-5'-phosphosulfat (PAPS).

einem nicht solubilisierten Enzym aus Rattenhirn. Die Tyrosylprotein Sulfotransferase scheint ein integrales Membranprotein zu sein (Lee und Huttner, 1985; Niehrs und Huttner, unpubliziert). Gegenwärtig wird in mehreren Labors versucht, das Enzym zu reinigen.

Obgleich einige Tyrosinsulfatierungsstellen in Proteinen identifiziert wurden, konnte bisher noch keine Konsensussequenz für die Tyrosinsulfatierung abgeleitet werden. Dem Autor und Lee und Huttner (1983) fielen auf, daß in der Nachbarschaft sulfatierter Tyrosinreste häufig Aspartat- und Glutamatreste vorkommen. Die Konsensussequenz für die Tyrosinsulfatierung scheint auf den ersten Blick stark degeneriert zu sein, da keine strenge Anordnung der Aminosäuren, die dem Tyrosinsulfatrest benachbart sind, zu erkennen ist, wenn die bereits identifizierten Tyrosinsulfatierungsstellen miteinander verglichen werden.

2.1.6. Biologische Funktionen der Tyrosinsulfatierung

Eine biologische Funktion der Tyrosinsulfatierung konnte bisher nur in dem tyrosinsulfatierten Peptidhormon Cholecystokinin (CCK) eindeutig gezeigt werden. Diese Studien waren möglich, da das kleine Hormon synthetisch in einem unsulfatierten Zustand hergestellt werden kann und so im Vergleich mit dem sulfatierten auf seine biologische Wirksamkeit hin ausgetestet werden kann. Dabei wurde festgestellt, daß unsulfatiertes CCK nur 0,4% der Aktivität

von sulfatiertem CCK in seiner Fähigkeit die Gallenblasenkontraktion oder die Freisetzung von alpha-Amylase aus isolierten Pankreaszellen zu stimulieren, besitzt (siehe Mutt, 1980). Eine Substitution des Tyrosinsulfates durch Serinsulfat konnte die biologische Aktivität nicht wieder herstellen (Bodanszky et al., 1968). Eine Substitution mit Tyrosinphosphat (Anastasi et al., 1968a) oder ϵ -Norleucinsulfat (in dem die Sulfatgruppe den gleichen Abstand zum Polypeptidrückgrat hat wie in Tyrosinsulfat) stellte 10 bzw. 40% der Normalaktivität wieder her (Bodanszky et al., 1968). Die kovalente Modifikation ist demnach ein essentieller Teil des CCK-Moleküls, der spezifisch an einer intra- oder intermolekularen Wechselwirkung des CCK-Moleküls beteiligt ist. Im Gegensatz zu CCK wird das Peptidhormon Gastrin in seiner biologischen Aktivität nicht durch die Tyrosinsulfatierung beeinflusst. Sowohl sulfatiertes als auch unsulfatiertes Gastrin, die beide physiologischer Weise vorkommen, haben die gleiche Potenz die Säurefreisetzung aus den Belegzellen des Magens zu stimulieren (Gregory und Tracy, 1964). Preliminäre Befunde zeigen, daß sulfatiertes Leucin-Enkephalin, das ca 20% des gesamten Leucin-Enkephalins im Organismus ausmacht, biologisch weitaus weniger aktiv ist (Unsworth et al., 1982).

Für keines der bekannten tyrosinsulfatierten Polypeptide ist bisher aufgeklärt worden, welche Funktion die Tyrosinsulfatierung hat. Es ist möglich, daß die

Modifikation neben sehr spezifischen Funktionen in einzelnen Proteinen auch eine generelle Funktion hat, z.B. während der Sekretion der Proteine.

3. Zielsetzung der Promotionsarbeit

Da die Tyrosinsulfatierung von Proteinen noch ein sehr junges Forschungsgebiet der Proteinbiochemie ist, sind noch sehr viele Aspekte dieser enzymatisch katalysierten Proteinmodifikation nicht untersucht worden. Aus diesem Grunde wird in dieser Promotionsarbeit die Möglichkeit wahrgenommen, mehrere der noch zahlreichen offenen zellbiologischen und biochemischen Fragestellungen parallel anzugehen. Darüber hinaus sollen die Grundlagen geschaffen werden, die Funktionen der Tyrosinsulfatierung durch gentechnologische sowie durch pharmakologische Methoden zu studieren.

Am Anfang der Arbeit steht eine Untersuchung verschiedener Spezies auf das Vorkommen von Tyrosinsulfatierung in Proteinen, die abklären soll, wann die Modifikation erstmals in der Evolution der Lebewesen auftrat. Unter Umständen erlaubt dieser Ansatz das erste Auftreten der Tyrosinsulfatierung mit dem erstmaligen Auftreten bestimmter Organisationsformen von Organismen oder zellulärer Organellesysteme zu korrelieren. Im zweiten Kapitel wird versucht die subzelluläre Lokalisation der Tyrosinsulfatierung exakt zu bestimmen und den Befund in einem funktionellen Zusammenhang zu diskutieren. Im dritten Kapitel soll durch einen Vergleich aller bekannten Tyrosinsulfatierungsstellen die Konsensusstruktur ermittelt werden, durch die das Enzym seine Proteinsubstrate erkennt.

Die Identifizierung der Konsensusstruktur soll es erlauben Tyrosinsulfatierungsstellen aus Primärstrukturen von Proteinen vorherzusagen. Das vierte Kapitel soll die Beziehung der Tyrosinsulfatierung zu einer anderen häufigen Modifikation sekretorischer Proteine untersuchen, der N-Glykosylierung. Es soll dabei die Anwendbarkeit der in Kapitel 3 gefundenen Konsensusstruktur getestet werden. Das fünfte und sechste Kapitel sollen Grundlagen für einen gentechnologischen Ansatz schaffen, Funktionen der Tyrosinsulfatierung durch gerichtete Mutagenese eines Modellproteins studieren. Dies beinhaltet die Suche, Identifizierung, Reinigung und biochemische Charakterisierung tyrosinsulfatierter Modellproteine sowie die Bestimmung der Sequenzposition eines sulfatierten Tyrosinrestes. Im letzten Kapitel wird ein pharmakologischer Ansatz gesucht, die Funktionen der Tyrosinsulfatierung in intakten Zellen zu studieren. Potentielle Inhibitoren sollen auf ihre cytopathischen Effekte, ihre Spezifität und Wirkungsweise hin charakterisiert werden. Spezifische Inhibitoren sollen es ermöglichen, die Funktionen der Tyrosinsulfatierung auch in weniger gut charakterisierten Proteinen zu untersuchen.

MATERIALIEN UND METHODEN

1. Radiochemikalien

L-(3,5-³H)Tyrosin (1,85 TBq/mMol), L-(¹⁴C(U))Tyrosin (1,85 GBq/mMol), trägerfreie (³⁵S)-Schwefelsäure oder Natrium (³⁵S)-Sulfat (>37 TBq/mMol), L-(6-³H)Fucose (0,93 TBq/mMol) oder L-(5,6-³H)Fucose (2,1 TBq/mMol), D-(4,5-³H(N))Galaktose (1,7 TBq/mMol), D-(2-³H)Mannose (0,89 TBq/mMol), (¹²⁵I) Protein A (1,1 GBq/mg) und L-(³⁵S)Methionin (>30 TBq/mmol) wurden von New England Nuclear bezogen. 3'-Phosphoadenosin 5'-Phospho(³⁵S)sulfat (PAPS; 4,8 TBq/mMol) wurde von Christof Niehrs synthetisiert und mir freundlicherweise überlassen.

2. In vivo-Markierungen mit anorganischem Sulfat

2.1. In vivo-Markierung von Hefezellen

Die Hefezellen in 5 ml einer exponentiell wachsenden Kultur von Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*), die mir freundlicherweise von Dr. Domdey, Genzentrum in Martinsried, überlassen wurde, wurden für 5 Minuten bei 150xg sedimentiert und einmal in 15 ml Medium ("Nitrogen base", Difco; ohne Aminosäuren, Vitamine, Spurenelemente, Glucose) gewaschen. Das Zellpellet nach Zentrifugation wurde in 5 ml Medium ("Nitrogen base" mit Glucose, Aminosäuren, Vitaminen, Spurenelementen und 50 µM Ammoniumsulfat) resuspendiert und 5x1 ml auf die Gefäße einer Plastikkulturplatte verteilt. Nach Zugabe von 0,1 mM, 10 µM, 1 µM, 0,1 µM und 10 µM L-Methionin wurde für 2 Stunden bei 30°C mit 18,5 MBq/ml (³⁵S)Sulfat/Gefäß markiert. Die Zellen wurden nach Zentrifugation der Kulturen in 100 µl Lämmli's Probenpuffer bei -20°C eingefroren und nach dem Auftauen für 5 Minuten gekocht. 400 µl der Übertände wurden mit 50 µg Rinderhämoglobin gemischt und Proteine nach Zugabe von 4 Volumenanteilen Aceton präzipitiert. Aliquote wurden durch SDS-PAGE analysiert. Die zellulären Proteine, die in Anwesenheit von 10 µM Methionin markiert wurden, wurden aus dem Gel durch Pronase eluiert und nach alkalischer Hydrolyse auf die Anwesenheit von Tyrosin-(³⁵S)sulfat untersucht.

2.2. In vivo-Markierung von Paramaecium-Zellen

Eine Zellkultur vom *Paramecium tetraurelia* (Wildtyp-Stamm K 401) wurde mir freundlicherweise von Dr. Zieseniß, Universität Konstanz, überlassen. *Paramecium*-Zellen einer vier Tage alten Kultur (späte log-Phase), die in Salatmedium (Difco) herangezogen wurde, wurden bei 150xg für 10 Minuten pelletiert und danach in einer Lösung von 5 mM PIPES(Na)₂, pH 7,06, 5 mM CaCl₂ und 1 mM KCl (Hungermedium) resuspendiert. Nach einmaligem Waschen in Hungermedium wurden die Zellen für 44 Stunden bei Raumtemperatur in 50 ml Hungermedium belassen. Eine mikroskopische Kontrolle mit Phasenkontrast bei 400-facher Vergrößerung zeigte keine Bakterien mehr. Nach Zentrifugation wurde das Volumen der Kultur auf 10 ml durch Abnahme des Überstandes eingeengt und mit 24,8 MBq/ml (³⁵S)Sulfat für 9 Stunden bei Raumtemperatur markiert. In einem zweiten Experiment wurde vor Zugabe des Isotops für weitere 9 Stunden in der An- oder Abwesenheit von 5 mM L-Cystein und 5 mM L-Methionin inkubiert und danach für 16 Stunden mit radioaktivem Sulfat markiert. Die Markierungsperiode wurde durch die Zugabe von Lämmli's Probenpuffer zu den durch Zentrifugation pelletierten Zellen beendet. Die Proteine der lysierten Zellen wurden durch SDS-PAGE und nachfolgende Fluorographie analysiert. Tyrosin(³⁵S)sulfat wurde nach alkalischer Hydrolyse der markierten Proteine durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese gesucht.

2.3. In vivo-Markierung der Wegschnecke *Arion* spez.

In eine 1 g schwere Wegschnecke der Gattung *Arion* spez. wurden 10 µl einer 150 mM NaCl-Lösung mit 148 MBq (³⁵S)Sulfat durch den Fuß in die Leibeshöhle injiziert. Nach einer Markierungsdauer von 20 Stunden wurde die Schnecke mit Ether betäubt und verschiedene Gewebe (von Mitteldarmdrüse, Darm, Lunge, Gonaden, Muskulatur, Pedal-Ganglion) präpariert (Kükenthal und Renner, 1980) sowie Hämolymphe und Schleim gesammelt. Nach Homogenisierung der Gewebe in Lämmli's Probenpuffer und Kochen wurden Aliquote mit 20-200 µg Protein durch SDS-PAGE und nachfolgende Fluorographie analysiert. Tyrosin(³⁵S)sulfat wurde nach alkalischer Hydrolyse durch eindimensionale Dünnschichtelektrophorese nachgewiesen.

2.4. In vivo-Markierung von *Drosophila melanogaster* Fliegen

Drosophila melanogaster Fliegen der Wildtypstämme Berlin und Oregon-R wurden wie von Mintzas und Kambysellis (1982) beschrieben aufgezogen. Vor der Markierung wurden die Fliegen, die mindestens 1 Tag alt waren, für 18 Stunden ohne Nahrung und Wasser in einem ventilierten Erlenmeyer-Kolben

belassen. Danach wurden die Fliegen mit Ether betäubt und in ein 20 ml-Glasszintillationsfläschchen transferiert. Auf dem Boden des Gefäßes waren drei Lagen Whatman 3MM Filterpapier, die mit 0,4 ml Markierungsmedium getränkt waren. Dieses Medium enthielt entweder 18,5-74 MBq (^{35}S)Sulfat, 1,85-7,4 MBq (^3H)Tyrosin, 1,1 MBq (^{14}C)Tyrosin oder 1,85 MBq (^{35}S)Methionin, sowie 10% (w/v) Saccharose und 1 mM L-Methionin. Die Fliegen wurden für 25-30 Stunden in dem Gefäß markiert, dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Für eindimensionale PAGE wurden Fliegen mit einem Glasstab in Lämmli's Probenpuffer zerquetscht und gekocht. Anschließend wurde ein kleines Loch in den Boden des Plastik-Eppendorffgefäßes gestochen, ein zweites Gefäß darunter gesteckt und die Anordnung für 5 Minuten bei 10000xg zentrifugiert. Die Cuticulatrümmer im oberen Gefäß wurden verworfen. Für zweidimensionale PAGE wurden die Fliegen in O'Farrells Lysispuffer homogenisiert und ein klares Homogenat wie oben beschrieben gewonnen. Zu dem Homogenat in O'Farrells Lysispuffer wurde zusätzlich bis zur Sättigung Harnstoff zugesetzt.

3. 81-04 Zellkultur und -markierung

Die Hybridoma Zelllinie 81-04 wurde von Sommer und Schachner (1981) beschrieben. Die Hybridomazellen sekretieren Immunglobulin M, das gegen das Zelloberflächenantigen 81-04 gerichtet ist. Die Zellen wurden bei 37°C in vollständigem DMEM (Dulbecco's Minimal Essential Medium, Boehringer) mit 4,5 g/l D(+)Glucose und 15% fötalem Kälberserum (FCS)(Gibco) in einer Atmosphäre von 10% Kohlendioxid kultiviert.

Für alle Markierungsexperimente wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 150xg für 5 Minuten pelletiert, dann einmal in eiskaltem PBS (Dulbecco's Vorschrift) gewaschen und nach einer weiteren Zentrifugation in Medium resuspendiert, wie im Detail beschrieben ist. Die Markierung der Zellen mit Radiochemikalien wurde, falls nicht anderst vermerkt, in 3,5 oder 5 cm Plastikpetrischalen (Nunc oder Falcon) in einem Inkubator bei 37°C und 10% CO_2 durchgeführt. Für alle Markierungsexperimente wurde Sulfat und Tyrosin freies DMEM verwendet (Magnesiumsulfat wurde durch Magnesiumchlorid ersetzt), das 4,5 g/l D(+)Glucose und 0,1-10% dialysiertes FCS enthielt ("Markierungsmedium"). Das FCS wurde gegen eine Lösung von 10 mM HEPES (Sigma), pH 7,3 und 150 mM NaCl bei 4°C dialysiert. Um die Effizienz der (^{35}S)Sulfatinkorporation zu erhöhen, wurden die Konzentrationen von L-Methionin und L-Cystein bis auf 2% der normalen DMEM-Konzentration abgesenkt. Dies hatte keinen nachweisbaren Effekt auf die Proteinsynthese, wie sich durch den unveränderten Einbau von (^3H)Tyrosin in Proteine zeigen ließ (siehe Kapitel 6).

3.1. Langzeitmarkierung

Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Hybridomazellen in Markierungsmedium mit 10% FCS zu einer Dichte von 10^7 Zellen/ml resuspendiert. Nach 30-minütiger Vorinkubation im Inkubator wurden entweder 18,5 MBq/ml (^{35}S)Sulfat, 1,85 MBq/ml (^3H)Tyrosin, 0,11 MBq/ml (^{14}C)Tyrosin, 0,93 MBq/ml (^3H)Fucose, 1,85 MBq/ml (^3H)Mannose, oder 0,93 MBq/ml (^3H)Galaktose, wie im Detail angegeben, zu den Zellkulturen gegeben. Nach 15-18 Stunden Markierungsdauer wurden Zellen und Medium durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 150xg abgetrennt. Die Zellen wurden in SDS lysiert, wie unter 6.1. beschrieben ist. Um Zelltrümmer zu beseitigen, wurde das Medium für 10 Minuten bei 10000xg zentrifugiert. Das Medium und die lysierten Zellen wurden für die Immunopräzipitation von IgM (siehe 6.1) verwendet. Zusätzlich wurden die Proteine, die aus einem Aliquot des Mediums mit Aceton präzipitiert wurden und ein Aliquot des Zellsates direkt einer SDS-Gelelektrophorese unterworfen.

3.2 Tunicamycin-/Monensinexperimente

Eine 0,1 mg/ml Stammlösung Tunicamycin (Boehringer) in 90% daEthanol und eine 0,1 mM Stammlösung Monensin (Calbiochem) in 90% Ethanol wurden verwendet. Die Zellkulturen wurden eine Stunde vor Zugabe der Isotope in An- oder Abwesenheit von 1 $\mu\text{g/ml}$ Tunicamycin oder 10^{-6} M Monensin vorinkubiert. Die Kontrollen erhielten eine entsprechende Menge 90% Ethanol (1% des Volumens). Die Markierungsdauer betrug 15 Stunden.

3.3 Puls-Chase-Experimente

Zur Pulsmarkierung mit (^{35}S)Methionin wurden die Zellen nach Waschen in eiskaltem PBS in 1 ml Markierungsmedium (0,1% FCS, Methionin- und Cystein-frei) zu einer Dichte von 10^8 Zellen/ml resuspendiert und nach 90 Minuten Äquilibrierung im Inkubator mit 3,7 MBq/ml (^{35}S)Methionin für 3 Minuten markiert. Danach wurde die Zellkultur sofort auf Eis gekühlt, die Zellen bei 4°C mit 150xg für 5 Minuten pelletiert und nach einmaligem Waschen in PBS in 1,2 ml Chasemedium (komplettes DMEM mit 15% FCS) resuspendiert, das bei 37°C in einer 10% CO_2 -Atmosphäre vorinkubiert wurde. Sofort nach Resuspension und nach den angegebenen Zeiten (Abb.2.6.) wurden 200 μl Aliquote der Zellkultur auf Eis gesammelt, nach Zugabe von 400 μl SDS-Lysispuffer (siehe 6.1.) für 5 Minuten gekocht und IgM wie unter 6.1. beschrieben immunopräzipitiert.

Zur Pulsmarkierung mit (^3H)Tyrosin wurden die Zellen zu einer Dichte von 10^8 Zellen/ml in Markierungsmedium mit 10% FCS resuspendiert und für 1 Stunde im Inkubator äquilibriert. Die Zellen wurden dann für 10 Minuten mit 1,5 MBq/ml (^3H)Tyrosin markiert, dann auf Eis gekühlt und für 10 Minuten bei 4°C und $150\times g$ zentrifugiert. Die Zellen wurden zu einer Dichte von 10^7 Zellen/ml in Chasemedium (komplettes DMEM mit 10% FCS) resuspendiert, das in einer 10% CO_2 -Atmosphäre bei 37°C vorinkubiert wurde und dann auf 6 Kulturschalen verteilt, die sofort wieder in den Inkubator gestellt wurden. Nach den angegebenen Chase-Zeiten, wurden einzelne Kulturschalen auf Eis gesetzt. Zellen und Medien wurden wie unter 3.1. und 6.1. beschrieben, weiter behandelt.

Für die Doppelpulsmarkierung wurden die Zellen zu einer Dichte von 10^8 Zellen/ml in Markierungsmedium mit 0,1% FCS resuspendiert und für 1 Stunde im Inkubator äquilibriert. Die Zellen wurden dann mit einer Mischung aus 18,5 MBq/ml (^{35}S)Sulfat und 12,2 MBq/ml (^3H)Galaktose für 5 Minuten im Inkubator markiert. Danach wurde die Zellkultur sofort auf Eis gekühlt und die Zellen bei 4°C in einem 50 ml Falcongefäß bei $150\times g$ für 5 Minuten pelletiert. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen zu einer Dichte von 10^7 Zellen/ml in Chase-Medium (komplettes DMEM mit 0,1% FCS und 2 mM D(+)Galaktose) resuspendiert, das bei 37°C in einer 10% CO_2 -Atmosphäre vorinkubiert wurde. Sofort nach dem Resuspendieren wurden der Zellkultur zwei Aliquots entnommen und auf Eis gekühlt (0-Minuten Werte). Die Zellsuspension im 50 ml Falcongefäß wurde im Inkubator während der Chasezeit auf eine langsam zirkulierende Plattform gestellt. Weitere Aliquots der gut suspendierten Zellkultur wurden zu den angegebenen Zeiten entnommen und auf Eis gesammelt. Zellen und Medien wurden weiter behandelt wie unter 3.1. beschrieben wurde.

3.4. Kurzzeitmarkierung mit (^{35}S)Sulfat

Die Hybridomazellen wurden in einem 15 ml Falcongefäß zu einer Dichte von 10^7 Zellen/ml in Markierungsmedium mit 0,1% FCS resuspendiert, das in einer 10% CO_2 -Atmosphäre bei 37°C vorinkubiert war. Nach 30 Minuten im Inkubator wurden die Zellen mit 37 MBq/ml (^{35}S)Sulfat in dem gut verschlossenen Gefäß in einem 37°C -Wasserbad markiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden dem Gefäß Aliquots der Zellsuspension entnommen und sofort entweder zu 0,25 Volumenanteilen einer kochenden Lösung von 10% SDS, 50 mM EDTA oder zu 0,5 Volumenanteilen 3-fach konzentriertem Lämmli-Probenpuffer zugegeben und für 5 Minuten gekocht. Aus den ersteren Proben wurde IgM immunopräzipitiert und auf Ricinbindung und Neuraminidaseempfindlichkeit getestet, wogegen die letzteren Proben direkt einer

SDS-Gelelektrophorese unterworfen wurden.

3.5. 20°C-Block

Hybridomazellen wurden in einem 50 ml Falcongefäß zu einer Dichte von 10^7 Zellen/ml in Markierungsmedium mit 0,1% FCS resuspendiert und für 5 Stunden auf einer langsam zirkulierenden Plattform bei 37°C äquilibriert. Um die Atmosphäre zu erhalten, wurde das Gefäß gut verschlossen aus dem Inkubator genommen und für 5 Minuten in ein 20°C-Wasserbad unter gelegentlichem Schütteln gestellt. Dann wurden die Zellen für 10 Minuten mit 37 MBq/ml (^{35} S)Sulfat im geschlossenen Gefäß markiert. Danach wurde das Gefäß auf Eis gestellt, die Zellen durch Zentrifugation bei 4°C gesammelt, in PBS gewaschen, in mehrere Aliquots aufgeteilt und in 15 ml Falcongefäßen in Chasemedium (komplettes DMEM, 0,1% FCS) entweder bei 0°C, 20 °C oder 37°C resuspendiert. In allen Fällen wurden die Medien in einer 10% CO₂-Atmosphäre vorinkubiert. Die Falcongefäße wurden verschlossen und entweder auf Eis gestellt (0-Minuten Werte), oder in Wasserbäder von 20°C bzw. 37°C. Aliquote der Zellkulturen in den Wasserbädern wurden nach 15 und 30 Minuten bei 20°C oder 37°C, wie angegeben, gesammelt und auf Eis gestellt. Zellen und Medien wurden wie unter 3.1. beschrieben weiterverarbeitet.

4. M31-Zellkultur

Die verwendete Hybridomazelllinie war eine freundliche Gabe von Dr. L. J. DeGennaro und wurde von dem Klon mit der Bezeichnung M31 erhalten, der aus einer Fusion der Myelomazelllinie Sp2/O-Ag 14 mit Milzzellen einer Maus hervorging, die mit gereinigtem Synapsin I immunisiert wurde. Die Hybridomazellen produzieren IgG, das gegen Synapsin gerichtet ist (Dr. DeGennaro, Martinsried, unpubliziert). Die Zellen wurden wie die 81-04 Zellen (siehe 3.) in DMEM (Boehringer oder Gibco) kultiviert, das mit 15% FCS versetzt war.

4.1. Langzeitmarkierung

Nach einmaligem Waschen in DMEM wurden die Zellen zu einer Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Markierungsmedium (sulfatfreies DMEM, 15% dialysiertes FCS) resuspendiert. Die Zellen wurden mit 1,85 MBq/ml (^{3} H)Tyrosin, 0,21 MBq/ml (^{3} H)Fucose, 0,21 MBq/ml (^{3} H)Mannose, 0,52 MBq/ml

(³H)Galaktose oder 18,5 MBq/ml (³⁵S)Sulfat für 18 Stunden markiert. Zellen und Medium wurden durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 150xg getrennt. Zur Affinitätsreinigung von IgG wurden Zellkulturüberstände verwendet, die für 60 min bei 150000xg ultrazentrifugiert wurden.

4.2. Tunicamycinexperimente

Eine 0,1 mg/ml Stammlösung Tunicamycin (Calbiochem) in 90% Ethanol wurde verwendet. Die Zellkulturen wurden für 75 Minuten mit 1,5 µg/ml Tunicamycin vor Zugabe der Isotope inkubiert. Die Kontrollkulturen erhielten eine entsprechende Menge 90% Ethanol.

5. PC12-Zellkultur

PC12-Zellen entstammen einem Nebennierenmarkstumor (Phaeochromocytom) der Ratte. Der verwendete Stamm (PC12 HR) wurde von Heumann et al. (1983) beschrieben. Die Zellen wurden in DMEM mit 5% FCS und 10% Pferdeserum bei 1,1 g/l Glucose kultiviert. Für radioaktive Markierungen mit (³H)Tyrosin oder (³⁵S)Sulfat wurde das gleiche Markierungsmedium (4,5 g/l Glucose, Sulfat- und Tyrosin-frei, 0,1-10% dialysiertes FCS, erniedrigtes Methionin und Cystein) und die gleichen radioaktiven Konzentrationen wie für 81-04 Hybridomazellen verwendet (siehe 3.).

6. Proteinreinigungen

6.1. Immunoaffinitätsreinigung von Immunoglobulin M

Für die Immunoaffinitätsreinigung von zellulärem IgM wurden pelletierte 81-04 Zellen für 5 Minuten in 400 µl eines SDS-Lysispuffers gekocht, der aus 2% SDS, 20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM Benzamidin (Sigma), 10 mM ε-Kapronsäure (Sigma), 5 mM EDTA, 300 Kallikreininhibitor Einheiten/ml Aprotinin (Sigma) und 1 mM PMSF bestand. Für die Immunoaffinitätsreinigung von sekretiertem IgM wurden Zellkulturüberstände ohne diese Behandlung benutzt. Zu Zelllysaten und Kulturüberständen wurden 1,5 ml 10% (w/v) NP-40 zugegeben, und das Volumen auf 15 ml mit Puffer A (0,5 M NaCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 5 mM EDTA, pH 7,5) in einem 15 ml Falcongefäß gebracht. Dann wurden

100 μ l einer 1:1-Suspension Anti-Maus-IgG-Agarose (Sigma A6531), die in Puffer A mit 0,1% Natriumazid äquibriert war, zugegeben. Nach 2 Stunden Inkubation bei 4°C auf einer rotierenden Scheibe wurden die Agarosepartikel durch drei minütige Zentrifugation bei 500xg gesammelt und viermal mit 15 ml eiskaltem Puffer A gewaschen. Gebundenes IgM wurde von den Agarosepartikeln durch Kochen in 1 ml des SDS-Lysispuffers eluiert. Das immunoaffinitätsgereinigte IgM in den Überständen wurde nach Zugabe von 50 μ g Rinderhämoglobin als Träger in 80% Aceton bei -20°C ausgefällt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 10000xg wurden die Niederschläge entweder in Lämmli's Probenpuffer für SDS-Gelelektrophorese, oder in 0,1 N NaOH gelöst, wie unter 7.6., 7.7. und 7.8. beschrieben wird.

6.2. Affinitätsreinigung von Immunoglobulin G2a

Zu den ultrazentrifugierten Zellkulturüberständen wurden 0,1 Volumenanteile von 10-fach konzentriertem Puffer B (0,15 M NaCl, 1% (w/v) NP-40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,5) von 4°C gemischt. Nach Zugabe von 200 μ l einer 1:1-Suspension Protein A-Sepharose (Sigma), äquibriert in Puffer B, wurden die Proben für 2 Stunden bei 4°C auf einer rotierenden Scheibe inkubiert (modifiziert nach Ivarie und Jones, 1979). Die Protein A-Sepharosepartikel wurden dann dreimal mit Puffer B gewaschen, und einmal mit 20 mM Na_2HPO_4 , pH 8,5. IgG wurde von den Agarosepartikeln mit einer Lösung von 0,15 M NaCl, 0,1 M Essigsäure pH 3,5 eluiert und das Eluat mit 0,5 Volumenanteilen 0,5 M Tris-HCl pH 8,5 neutralisiert. Aus dem neutralisierten Eluat wurde IgG durch Zugabe von 4 Volumenanteilen Aceton bei -20°C präzipitiert. Der Niederschlag nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 10000xg wurde in Lämmli's Probenpuffer in der An- oder Abwesenheit von β -Mercaptoethanol durch Kochen aufgelöst. In einigen Experimenten wurde affinitätsgereinigtes IgG mit Synapsin I-Sepharose 4B (eine freundliche Gabe von Dr. DeGennaro) in Puffer B ohne NP-40 für 2 Stunden inkubiert. Die Sepharosepartikel wurden dann ausgiebig mit Puffer B (mit 0,3 M NaCl) gewaschen. Gebundenes IgG wurde durch Kochen in Lämmli's Probenpuffer eluiert.

6.3. Reinigung von Dotterprotein 2 aus adulten Drosophilafliegen

6.3.1. Koreinigung von Dotterprotein 1, 2 und 3

Fliegen wurden aufgezogen, wie von Mintzas und Kambyseilis

(1982) beschrieben, und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -70°C gelagert. Zu 9 g Fliegen wurde 1 g in vivo mit (^{35}S)Sulfat markierte Fliegen beigemischt. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach Zugabe von 35 ml Puffer C (0,5 M NaCl, 50 mM Tricin pH 7,0, 5 mM EDTA, 2 mM PMSF, 20 mM Benzamidin, 10 mM ϵ -Kapronsäure, 1% (v/v) Aprotinin) wurden die Fliegen durch zehn Passagen in einem Teflon-Glas-Homogenisator bei 3000 rpm homogenisiert. Das Homogenat (bezeichnet als Fraktion A) wurde dann für 3 Stunden bei 150000xg ultrazentrifugiert. Zu dem klaren orange-gelben Überstand (bezeichnet als Fraktion B) wurde frisches PMSF (1 mM) zugesetzt und zweimal gegen 5 l 1 mM HEPES pH 7,0 dialysiert. Das weiße Präzipitat im Dialyseschlauch wurde durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 10000xg gesammelt. Der Niederschlag wurde dann in einem kleinen Volumen Puffer C resuspendiert (bezeichnet als Fraktion C). Gesättigte Ammoniumsulfatlösung von pH 7,0 wurde langsam der Fraktion C bis zu einer Sättigung von 40 Prozent zugesetzt. Nach 30 Minuten wurde das präzipitierte Material durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 10000xg entfernt und der Überstand zu dem frischen PMSF (1 mM) zugesetzt wurde, zweimal gegen 5 l 1 mM HEPES pH 7,0 dialysiert. Der entstandene Niederschlag wurde durch Zentrifugation für 20 Minuten bei 10000xg gesammelt und in 1% SDS, 1mM PMSF aufgelöst (bezeichnet als Fraktion D). Aliquots dieser Fraktion wurden bei -20°C gelagert. Proteinkonzentrationen in den einzelnen Fraktionen wurden nach der Methode von Lowry et al.(1951) bestimmt. Der Anteil der Dotterproteine 1, 2 und 3 am Gesamtproteingehalt der Fraktion D wurde durch Integration von Peakflächen einer Aufzeichnung eines Coomassieblau-gefärbten SDS-Gels bei 540 nm bestimmt (siehe Abb.6.2.). Die Ausbeute der Dotterproteine nach den einzelnen Reinigungsschritten wurde aus der Wiederfindung der Dotterprotein-spezifischen ^{35}S -Radioaktivität bestimmt.

6.3.2. Reinigung von Dotterprotein 2

4,8 mg Protein der Fraktion D, die zu 80% aus den Dotterproteinen 1, 2 und 3 bestand, wurden durch 80% Aceton bei -20°C präzipitiert. Nach Zentrifugation für 10 Minuten mit $10000\times g$ wurde der Niederschlag einmal in kaltem 80% Aceton resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Der Niederschlag wurde 1 Stunde an der Luft getrocknet und dann in $200\text{ }\mu\text{l}$ O'Farrell's Lysispuffer aufgelöst. $50\text{ }\mu\text{l}$ dieser Lösung (1,2 mg Protein) wurden pro Rundgel zur isoelektrischen Fokussierung aufgeladen und wie unter 7.2. beschrieben elektrophoretisiert. Nach Ende der zweiten Elektrophorese wurden die SDS-Gele für 5 Minuten mit Coomassie Blau angefärbt und für eine halbe Stunde in 50% Methanol, 5% Isopropanol und 5% Essigsäure entfärbt. Die isoelektrischen Varianten von Dotterprotein 2 wurden mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und weiter entfärbt. Nach ausgiebigem Waschen in Aqua bidest. wurden die Dotterprotein 2 enthaltenden Gelstücke zerkleinert und lyophilisiert.

6.4. Antigenaffinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern gegen die Dotterproteine 1, 2 und 3

3 ml einer 1:1-Suspension Cyanbromid-aktivierter Sepharose 4B (Pharmacia) (vorbereitet entsprechend einer beigelegten Produktinformation) wurden mit 1 mg Protein der Fraktion D (siehe 6.3.1.) in $0,1\text{ M NaHCO}_3$, $0,5\text{ M NaCl}$ für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einer sich drehenden Scheibe inkubiert. Nach Zugabe von $0,8\text{ M}$ Ethanolamin pH 8 wurde für eine weitere Stunde inkubiert. Der ganze Ansatz wurde dann in eine Säule gefüllt, mit $100\text{ ml } 1\text{ M NaCl}$, $0,1\text{ M NaHCO}_3$ gewaschen und mit $0,1\text{ M}$ Natriumazid bei 4°C gelagert. Das Antiserum nach der 4. Boosterinjektion (siehe 13.) wurde mit $0,15\text{ mg/ml}$ SDS-denaturiertem Protein aus männlichen Fliegen für 24 Stunden bei 4°C präabsorbiert. 2 ml dieses so behandelten Antiserums wurde bei einer Flußrate von $0,1\text{ ml/min}$ bei Raumtemperatur über die Dotterprotein Sepharose 4B-Säule passagiert. Die Säule wurde anschließend mit 50 mM Tris-HCl pH 7,5, $0,5\text{ M NaCl}$ solange gewaschen, bis die Absorption bei 260 nm den Ausgangswert vor Beladung der Säule erreichte (120 min, Flußrate $0,4\text{ ml/min}$). Gebundene Antikörper wurden entweder mit 50 mM Ethanolamin pH 11 oder mit 4 M Magnesiumchlorid eluiert. Nach Einengung der Eluate durch Vakuumdialyse gegen 50 mM Tris-HCl pH 7,5, $0,15\text{ M NaCl}$ wurden Aliquote durch SDS-Gelelektrophorese, mit einem Protein Microassay (Biorad) und durch Messung der Absorption bei 280 nm analysiert. Aliquote der affinitätsgereinigten Antikörper wurden mit $0,1\%$ Natriumazid bei einer Konzentration von $60\text{ }\mu\text{g/ml}$ IgG bei -20°C gelagert.

6.5. Anreicherung von Secretogranin I und II aus PC12-Zellen

PC12-Zellen, die in 3,5 cm Kulturschalen für 14 Stunden mit 1,85 MBq/ml (^3H)Tyrosin markiert wurden, wurden einmal mit 1 ml PBS von 4°C gewaschen. Nach Zugabe von 0,5 ml eines Triton-Puffers (1% (w/v) Triton X-100, 10 mM EDTA, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 5 mM β -Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) wurden die Zellen für 15 Minuten auf Eis lysiert. Die Lysate wurden in Eppendorffgefäße transferiert und 5 Minuten gekocht (Lee und Huttner, 1983). Zu den Überständen nach 20 Minuten Zentrifugation mit 10000xg wurden 4 Volumenanteile Aceton zugegeben und Proteine für 2 Stunden bei -20°C präzipitiert. Die Niederschläge nach Zentrifugation wurden in Lämmli's Probenpuffer aufgelöst und einer SDS-PAGE unterworfen.

7. Proteinanalytische Methoden

7.1. Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D SDS-PAGE)

Eindimensionale SDS-PAGE wurde durchgeführt, wie von Lämmli (1970) beschrieben. Lämmli's Probenpuffer wurde, falls nicht anderst angemerkt, mit 3,3% (v/v) β -Mercaptoethanol verwendet. Modifizierungen der Färbelösung und der Entfärbelösung sind beschrieben in Lee und Huttner (1983). Als Molekulargewichtstandards für 7,5%-15% Polyacrylamidgele wurde eine Mischung der Firma Pharmacia verwendet mit Phosphorylase (97 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor aus Sojabohnen (20 kDa) und α -Lactalbumin (14,4 kDa). Als Molekulargewichtstandards für 4%-6% Polyacrylamidgele wurde ebenfalls eine Mischung von Pharmacia verwendet mit Thyroglobulin (669 kDa), Ferritin (440 kDa), Katalase (232 kDa), Lactatdehydrogenase (140 kDa) und Rinderserumalbumin (67 kDa).

7.2. Zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D SDS-PAGE)

Zweidimensionale SDS-PAGE wurde durchgeführt wie von O'Farrell (1975) beschrieben. Folgende Mischungen von Ampholyten (v/v) (alle von LKB) wurden verwendet. Kapitel 2, Abb.2.15.: pH 5-7; 1,4% Ampholyt pH 8-9,5 und 1,4% Ampholyt pH 7-9.

Kapitel 4, Abb.4.6.: 3,5% Ampholyt pH 3,5-10 und 3,5% Ampholyt pH 7-9.

Kapitel 5, Abb.5.2., 5.3. und Kapitel 6, Abb.6.3.: 3,5% Ampholyt pH 3,5-10 und 3,5% Ampholyt pH 5-7.

Kapitel 5, Abb.5.4.: 3,5% Ampholyt pH 3,5-10, 1,75% Ampholyt pH 7-9 und 1,75% Ampholyt pH 5-7.

NEPHGE wurde wie von O'Farrell et al. (1977) beschrieben durchgeführt. 3,5% (v/v) Ampholyt (LKB) pH 3,5-9,5 wurde verwendet. Die Rundgele wurden für 4 Stunden mit 400 V elektrophoretisiert.

7.3. Proteintransfer auf Nitrocellulosefilter und Immunomarkierung

(³⁵S)Sulfat-markierte Proteine wurden durch zweidimensionale PAGE aufgetrennt und die Proteine auf Nitrocellulosefilter (Schleicher und Schüll, BA85) übertragen, wie im Detail von Vaessen et al. (1981) beschrieben wurde. Nach Autoradiographie wurden die Filter für 2-4 Stunden in PBS mit 8% Rinderhämoglobin oder 8% Rinderserumalbumin, 0,1% Natriumazid (Blockierpuffer) bei Raumtemperatur inkubiert. Antiseren oder affinitätsgereinigte Antikörper wurden in den Konzentrationen, die in den Legenden der Abbildungen angegeben sind, verwendet und die Filter für 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in Blockierpuffer inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Filter mit PBS, das 0,1% NP-40 enthielt, wurden die Filter mit Blockierpuffer inkubiert, der 400000 cpm/ml (¹²⁵I)Protein A und 0,1% NP-40 enthielt. Nach ausgiebigem Waschen mit PBS, 0,1% NP-40 wurden die Nitrocellulosefilter auf Filterpapier getrocknet und anschließend fluorographiert (siehe 15.).

7.4. Subklassenbestimmung von Immunoglobulin G

Die Subklasse des IgG der Hybridomazelllinie M31 wurde durch subklassenspezifische Antiseren bestimmt. Der Doppeldiffusionstest (Ouchterlony, 1983) wurde in 1% Agar (elektrophoretischer Grad), 20 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,5, 150 mM NaCl und 2,5% Polyethylenglykol 4000 für 24 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. 3-8 µg IgG wurden getestet gegen anti-Maus-IgG2a (Ziege, Meloy), anti-Maus-IgG1 (Ziege, Meloy), anti-Maus-IgG2b (Kaninchen, Bionetics) und anti-Maus-IgG3 (Kaninchen, Miles).

7.5. Analytischer Papainverdau von Immunoglobulin G

Affinitätsgereinigtes IgG (5-20 µg) das mit (^3H)Tyrosin oder (^{35}S)Sulfat markiert war, wurde in 0,17 M Trisacetatpuffer, pH 7,8 mit 650 µg Rinderhämoglobin (Sigma, Typ II) und 10 mM L-Cystein gemischt. Nach Zugabe von 5 µg Papain (Worthington) wurden die Proben in einem Volumen von 1,25 ml für 8 Stunden bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 0,2 mM PMSF (Serva), 10 µM Leupeptin (Sigma) und 10 mM 4-Hydroxyquecksilberbenzoesäure (Calbiochem) gestoppt. Die Proben wurden dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur mit Protein A-Sepharose inkubiert. Die Protein A-Sepharosepartikel wurden danach ausgiebig mit Puffer B (siehe 6.2.) gewaschen, der PMSF, Leupeptin und 4-Hydroxyquecksilberbenzoesäure wie oben angegeben, enthielt. Zu den Protein A-Sepharose Überständen wurden 4 Volumenanteile Aceton zugegeben und die Proben über Nacht bei -20°C gelagert. Die Proteinniederschläge aus den Überständen und die gewaschenen Protein A-Sepharosepartikel wurden in Lämmli's Probenpuffer mit PMSF, Leupeptin und 4-Hydroxyquecksilberbenzoesäure für 5 Minuten vor Zugabe von 3,3% β -Mercaptoethanol gekocht und dann einer SDS-PAGE auf 13%-Gelen unterworfen.

7.6. Neuraminidasebehandlung

Acetonniederschläge die immunopräzipitiertes IgM enthielten, wurden in 20 µl 0,1 N NaOH aufgelöst und sofort mit 400 µl einer Lösung von 100 mM Natriumacetat pH 5,0, 9 mM CaCl_2 , 150 mM NaCl (nach beigelegter Produktinformation), 1% Aprotinin (Sigma) und 1 mM PMSF auf pH 5,5 eingestellt. Die Proben wurden über Nacht in der An- oder Abwesenheit von 0,25 U/ml Neuraminidase (*Clostridium perfringens*, Sigma Typ X) bei 30 °C inkubiert. Protein wurde durch 80% Aceton präzipitiert und die entstehenden Niederschläge für die Analyse durch SDS-PAGE in Lämmli's Probenpuffer aufgelöst.

7.7. Endo H-Behandlung

Acetonniederschläge die immunopräzipitiertes IgM enthielten, wurden in 20 µl 0,1 N NaOH aufgelöst und sofort mit 400 µl einer Lösung von 100 mM Natriumzitat, pH 5,5, 0,1% SDS (nach beigelegter Produktinformation), 1% Aprotinin und 1 mM PMSF auf pH 6,0 eingestellt. Die Proben wurden dann über Nacht in der An- oder Abwesenheit von 15 mU/ml endo- β -N-acetylglukosaminidase H (Seikagaku) bei 30°C inkubiert und wie in 7.6. beschrieben weiter analysiert.

7.8. Ricinbindungstest

Acetonniederschläge die immunopräzipitiertes IgM enthielten, wurden in 20 µl 0,1 N NaOH aufgelöst und sofort mit 400 µl einer Lösung von 0,1 M Tris-HCl, pH 7,0, 1 M NaCl, 1 mM CaCl_2 und 1 mM MgCl_2 auf pH 7,5 eingestellt. Dann wurden 80 µl einer 1:1-Suspension Ricin-Agarose (Baenziger und Fiete, 1979) (Sigma L2757), in obigem Puffer äquilibriert, zugegeben und für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Vibrax Schüttler inkubiert. Durch 5 Minuten Zentrifugation bei 500xg wurden die Ricinagarosepartikel pelletiert und anschließend zweimal mit obigem Puffer gewaschen. Gebundenes IgM wurde durch Kochen der Partikel in Lämmli's Probenpuffer eluiert. Protein in den Überständen wurde durch Aceton präzipitiert und die resultierenden Niederschläge in Lämmli's Probenpuffer aufgelöst. Die Proben wurden durch SDS-PAGE analysiert.

8. Analysen von Sulfoproteinen

8.1. Alkalische Hydrolyse

Sulfoproteine, die mit (^{35}S)Sulfat, (^3H)Tyrosin oder mit (^{14}C)Tyrosin markiert waren, wurden durch ein- oder zweidimensionale PAGE isoliert, und anschließend aus fixierten, gefärbten und getrockneten Gelen durch Behandlung mit Pronase oder Trypsin eluiert, wie im Detail beschrieben wurde (Huttner, 1984). Nach Gefriertrocknung wurden die Eluate in 0,2 M $\text{Ba}(\text{OH})_2$ bei 110°C für 20 Stunden hydrolysiert, durch verdünnte Schwefelsäure neutralisiert und die Überstände nach Zentrifugation durch Dünnschichtelektrophoresen analysiert, wie im Detail beschrieben wurde (Huttner, 1984).

8.2. Pronaseverdau

Partielle hydrolytische Freisetzung von Tyrosinsulfat aus Proteinen wurde durch Inkubation von markierten Proteinen in Gelstücken für 30 Stunden bei 37°C mit 100 µg Pronase (Boehringer) erreicht. Der Pronaseverdau wurde nach Gefriertrocknung direkt durch Dünnschichtelektrophorese untersucht (Huttner, 1984). Der Pronaseverdau der in Abb.2.2. zu sehen ist, wurde mit 1 mg/ml Pronase durchgeführt. Anschließend wurde Protein durch 80% Aceton präzipitiert und die Überstände nach Trocknen in einer Speedvac durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese analysiert.

8.3. Ein- und zweidimensionale Dünnschichtelektrophoresen

Die Dünnschichtelektrophoresen wurden wie von Huttner (1984) im Detail beschrieben, durchgeführt.

8.4. Bestimmung der Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung in Proteinen

(^{14}C)Tyrosin oder (^3H)Tyrosin markierte Proteine wurden durch ein- oder zweidimensionale SDS-PAGE isoliert. Die Radioaktivität in den Gelbanden wurde durch Pronasebehandlung (Huttner, 1984) eluiert, und die Eluate alkalisch hydrolysiert (Huttner, 1984). Die neutralisierten Hydrolysate wurden mit einer Spur Phenolrot und je 5 μg Tyrosinsulfat und Tyrosin gemischt und auf eine 20x20 cm Zellulosedünnschichtplatte (Schleicher und Schüll, F1440) 5,5 cm von der linken Kante und 3 cm von der unteren Kante entfernt aufgetragen. Elektrophorese in der ersten Dimension wurde solange durchgeführt, bis der Phenolrotmarker 5 cm in Richtung Anode (ca 70 min bei 500 V) migriert war. Nach dem Trocknen wurde die Platte wie in Abb.5.6. zu sehen ist, einer aufsteigenden Chromatographie in Methanol:Wasser:Pyridin = 80:20:4 (Redfield, 1953) unterworfen, bis die Lösungsmittelfront 1 cm unter der oberen Kante angelangt war (ca 3 h). Danach wurde die Platte getrocknet, mit 1% Ninhydrin (Merck) in Aceton eingesprüht und autoradiographiert. Die ^{14}C - und ^3H -Radioaktivität in den Flecken der Tyrosin- und Tyrosinsulfatstandards wurde ausgeschnitten und durch Flüssigkeits- Szintillationszählung (siehe 14.) bestimmt. Der Wiederfindungsfaktor der Aminosäuren wurden mit Hilfe radioaktiver Aminosäuren bestimmt, die parallel zu den Proben unter gleichen Bedingungen analysiert wurden (siehe Legende der Tab.5.2.).

9. Analyse von Sulfopeptiden

9.1. Elution von Sulfopeptiden aus Gelstücken durch Trypsin

Nach der Abtrennung von Dotterprotein 2 von Dotterprotein 1 und 3 durch zweidimensionale, präparative PAGE (siehe 6.3.2.) wurden die Gelstücke, die Dotterprotein 2 enthielten, herausgeschnitten, mit einer Skalpellklinge zerkleinert und lyophilisiert. Dotterprotein 2 war entweder von Anbeginn der Reinigung mit (^{35}S)Sulfat markiert, oder wurde erst kurz vor dem Verdau durch Zugabe von (^{35}S)Sulfat

markiertem Dotterprotein 2 in Gelstückchen aus analytischen 2D-Gelen markiert. Die Gelstückchen wurden in 10 ml AB-Puffer (50 mM Ammoniumbikarbonat, pH 8,5, 0,1 mM CaCl_2 , eine Spur Toluol) mit 20 μg TPCK-Trypsin (Worthington) aufgeschwollen. Nach 18 Stunden bei 30°C wurde das Eluat abgenommen und separat weiter inkubiert. Die Gelstückchen (ca 2,5 ml) wurden für weitere 22 Stunden mit 10 ml AB-Puffer und 10 μg frischem Trypsin weiter eluiert. Die zwei Eluate wurden vereint und die Gelstückchen ein drittes Mal mit 2,5 ml AB-Puffer für 4 Stunden eluiert. Zu den vereinten Eluaten (20 ml) wurde nochmals 10 μg Trypsin zugesetzt und für weitere 4 Stunden inkubiert. Der Verdau dauerte insgesamt 48 Stunden. Insgesamt wurden 40 μg Trypsin für ca 400 μg Dotterprotein 2 eingesetzt. Die Elutionseffizienz der (^{35}S)Sulfat-Markierung wurde durch die Szintillationszählung kleiner Aliquote des Eluates verfolgt und quantifiziert.

9.2. Anreicherung von Sulfopeptiden durch C_{18} -Chromatographie

Die tryptischen Eluate (pH 8,5) von Dotterprotein 2 wurden mehrere Male über eine mit Methanol aktivierte C_{18} -SEP-PAK-Säule (Waters) passagiert, bis alles Coomassie Blau daran absorbiert war. Der Durchfluß wurde durch Gefriertrocknung eingeengt und durch HPLC analysiert. In einem ersten Schritt wurde gebundenes Material langsam mit 4 ml 20% Methanol eluiert. In einem zweiten Schritt wurde mit 4 ml 100% Methanol eluiert (blaue Fraktion). Die 20%-Methanolfraktion wurde im Vakuum eingeengt, auf 20% Ameisensäure eingestellt und durch HPLC analysiert. Die 100%-Methanolfraktion wurde verworfen.

9.3. HPLC-Trennung von Sulfopeptiden

Eine HPLC-Anlage der Firma LKB mit einer 1ml-Probenschleife wurde verwendet. Alle Trennungen wurden entweder auf einer 10 oder 20cm Vydac RP_{18} -Säule mit 10 μm Porengröße durchgeführt. Als Lösungsmittel wurde 0,1% Trifluoressigsäure (Fluka, Sequenziergrad) in Aqua bidest. verwendet. Die Säule wurde mit einem Gradienten (B) von 0-30% Acetonitril (Merck, für die Chromatographie) über die Zeiten, die in den Legenden zu den Abbildungen angegeben sind, entwickelt. Die Flußrate betrug in allen Experimenten 2 ml/min bei Drücken zwischen 70 und 120 bar. Peptide wurden durch ein UV-Durchflußspektrophotometer (LKB) bei 206 nm registriert. Der gesamte Durchfluß eines HPLC-Laufes wurde in Peak- und Zwischenfraktionen von Hand gesammelt, und Aliquote dieser Fraktionen durch

Flüssigkeitsszintillationszählung zur Identifizierung von Sulfopeptiden analysiert. Aliquote der Sulfopeptidfraktionen wurden verwendet für (1) Rechromatographie, (2) Aminosäureanalyse, (3) N-terminale Sequenzierung und (4) falls angegeben, für einen Subverdau mit Chymotrypsin.

9.4. N-terminale Sequenzierung von Sulfopeptiden

N-terminale Aminosäuresequenzierung wurde nach der Methode von Edman (1949) in einem Gasphasensequenator (Applied Biosystems) von Dr. Friederich Lottspeich, Genzentrum in Martinsried, durchgeführt. Die Phenylthiohydantoin-derivate der Aminosäuren wurden isokratisch getrennt (Lottspeich, 1980 und 1985).

9.5. Aminosäureanalysen

Die Aminosäureanalysen wurden im Labor von Dr. Friederich Lottspeich, Genzentrum in Martinsried, mit der Orthophtaldialdehyd-Methode (Simons und Johnson, 1978) durchgeführt.

9.6. Chymotryptischer Subverdau von Sulfopeptiden

Aliquote der Sulfopeptidfraktionen wurden in einer Speevac bis zur Trockenheit eingeengt und dann in 100 µl 50 mM Ammoniumbikarbonatpuffer, pH 8,5, 5 mM EDTA aufgelöst. Die Proben wurden in der An- oder Abwesenheit von 1 µg TLCK-Chymotrypsin (Sigma) für 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Der Verdau wurde durch die Zugabe von 10% Ameisensäure zu einer Konzentration von gestoppt und die Proben durch HPLC analysiert. Der gesamte Durchfluß eines Laufes wurde gesammelt und alle Fraktionen durch Flüssigkeitsszintillationszählung analysiert. Die identifizierten Sulfopeptide wurden durch N-terminale Sequenzierung und Aminosäureanalyse untersucht.

9.7. Sulfopeptidkartierung

Mit (³⁵S)Sulfat markierte Proteine in getrockneten, gefärbten, fixierten und salicylierten Gelen wurden ausgeschnitten und in 50% Methanol, 10% Essigsäure

aufgeschwollen. Nach Elution des Salicylats wurden die Gelstückchen ausgiebig in Aqua bidest. gewaschen und anschließend gefriergetrocknet. Nach Aufschwellen in 50 mM Ammoniumbikarbonat, pH 8,5 mit 25 µg Protease (TLCK-Trypsin, Worthington, oder TPCK-Chymotrypsin, Sigma) und einer Spur Phenolrot, wurde für 48-80 Stunden bei 37°C verdaut. Nach 24 Stunden wurden 10 µg frische Protease (1 mg/ml frisch zubereitete Lösung) zugesetzt. Nach Gelfrier Trocknung wurde das Lyophilisat in Wasser gelöst und nochmals gefriergetrocknet. Der Rückstand wurde in pH 3,5 Elektrophoresepuffer (10% Essigsäure, 1% Pyridin) aufgelöst, kurz zentrifugiert und der Überstand auf eine Dünnschichtcellose aufgetragen. pH 3,5-Elektrophorese bei 500 V in der ersten Dimension wurde solange ausgeführt, bis der Phenolrotmarker kurz vor der Pufferfront an der Anode angelangt war. Nach 2 Stunden Trocknen wurde aufsteigend in Butanol: Pyridin: Essigsäure: H₂O = 13:10:2:8 (Elder et al., 1977) chromatographiert. Alternativ wurde als Laufmittel n-Propanol: 2-Butanol: Isoamylalkohol: Pyridin: H₂O = 1:1:1:3:3 (Erikson und Erikson, 1980) verwendet (Abb. 5.7.)., wobei dann die Chromatographie in der ersten Dimension erfolgte.

10. In vitro-Sulfatierung von Immunoglobulin M

5x10⁸ 81-04 Hybridomazellen wurden für 5 Minuten bei 150xg pelletiert, einmal in PBS bei 4°C gewaschen und in 0,5 ml Puffer D (3mM Imidazol-HCl, pH 7,00, 0,25 M Saccharose, 25 mM NaF, 2,5 mM MgCl₂, 2,5 mM MnCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol und 1 mM PMSF) resuspendiert. Durch 5 Passagen durch einen Stahlkugelhomogenisator (modifiziert nach Balch et al., 1984, mit einer 18 µm Lichtung) wurden die Zellen nahezu vollständig aufgeschlossen, wie nach Phasenkontrastmikroskopie bei 400-facher Vergrößerung zu erkennen war. Die meisten Zellkerne blieben nach der Homogenisierung intakt. Der Homogenisator wurde einmal mit 0,5 ml Puffer D gespült und die Spülflüssigkeit mit dem Homogenat vereinigt. Zu dem Homogenat wurden 20 µl 10 mg/ml Hexokinase (Boehringer) in 250 mM D(+)-Glucose zugegeben und 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 4°C mit 800xg wurde zu Überstand und resuspendiertem Pellet 0,79 GBq/ml 3'-Phosphoadenosin-5'-Phospho(³⁵S)sulfat (ca 0,2 µM PAPS Endverdünnung) zugegeben und für 2 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,1 Volumenanteilen 10% SDS und anschließendem Kochen gestoppt. 10% der Lysate wurden durch SDS-PAGE analysiert. Der Rest des 800xg-Überstandes wurde zur Immunopräzipitation von IgM verwendet (siehe 6.1.).

11. Synthesen

11.1. Synthese von Tyrosin(^{35}S)sulfat

Tyrosin(^{35}S)sulfat, das als Standardsubstanz verwendet wurde, wurde aus (^{35}S)Schwefelsäure und L-Tyrosin (Sigma) nach der Methode von Reitz et al. (1946) mit den folgenden Modifikationen synthetisiert. 370 MBq (^{35}S)Schwefelsäure ($>>37$ TBq/mMol) in 400 μl wurde in einer Speedvac eingetrocknet. Nach Zugabe von 20 μl unmarkierter Schwefelsäure (Merck, p.A.) (erwartete spezifische Aktivität der Mischung ca 1 GBq/mMol) wurde gemischt und die Schwefelsäure auf Trockeneis gekühlt. 50 mg Tyrosin wurden hinzugegeben und für 15 Minuten mit einem Glasstab bei -9°C Eis-KCl-Gemisch gerührt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 1 ml 0,38 M $\text{Ba}(\text{OH})_2$ gestoppt. Nach gründlichem Mischen wurde für 10 Minuten bei 10000xg zentrifugiert. Der Bariumsulfatniederschlag wurde verworfen und der Überstand in Anwesenheit einer Spur Phenolrot mit verdünnter Schwefelsäure auf pH 7 eingestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand in einer Speedvac auf 200 μl eingeeengt, auf eine Cellulosedünnschichtplatte aufgetragen, und bei pH 3,5 und 500 V für 45 Minuten elektrophoretisch getrennt. Zu beiden Seiten des aufgetragenen Reaktionsproduktes wurden je 10 μg Tyrosinsulfatstandard komigriert und die Spuren nach dem Lauf abgetrennt und mit Ninhydrinreagenz zur Identifizierung der Tyrosinsulfatposition behandelt. Nach 10 Sekunden Autoradiographie der Celluloseplatte wurde die Radioaktivität, die zwischen den Tyrosinsulfatstandards komigrierte, nach Benetzen mit Wasser von der Dünnschichtplatte abgekratzt und von der Cellulose in einer kleinen Säule mit 10 ml Aqua bidest. eluiert. Das Eluat wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. 5 μl des Eluates enthielten 135000 cpm/ml und ergaben nach Vergleich der Ninhydrinfärbung mit Tyrosinsulfatstandard eine Konzentration von ca 0,5 μg Tyrosinsulfat/ 5 μl . Die Ausbeute betrug 4,44 MBq.

11.2. Synthese von (^3H)Tyrosinsulfat und (^{14}C)Tyrosinsulfat

Ausgehend von L-(3,5- ^3H)Tyrosin und L-($^{14}\text{C}(\text{U})$)Tyrosin verlief die Synthese mit geringen Abänderungen wie für Tyrosin(^{35}S)sulfat beschrieben wurde. Es wurden 40 μl unmarkierte Schwefelsäure verwendet.

12. Versuche mit Sulfatierungshemmern

12.1. Applikation von Sulfatierungshemmern

Zu M31- und 81-04 Hybridomazellen in Markierungsmedium (siehe 3.) wurden die Natriumsalze folgender Anionen in einer Konzentration von 1 mM 1 Stunde vor Isotopenzugabe hinzugefügt : Thiosulfat (Merck, p.A.), Wolframat (Wolframsäure, Merck, reinst; titriert mit 1 N NaOH auf pH 7), Chlorat (Merck, p.A.), Perchlorat (Merck, p.A.), Molybdat (Molybdänsäure, Sigma; titriert mit 1 N NaOH auf pH 7), Nitrat (Merck, p.A.), Fluorosulfonat (Fluorsulfonsäure, Fluka, purum; titriert mit 1 N NaOH auf pH 5), Selenat (Selenensäure, Fluka, purum; titriert mit 1 N NaOH auf pH 7). 0,1 M Stammlösungen dieser Substanzen wurden vor ihrer Anwendung durch Filtration durch 0,4 µm Filter (Millipore und Nalgene) sterilisiert. Eine Stammlösung von 0,1 M Atractylosid (Sigma) wurde in 50% Ethanol erstellt und die Zellen in der Gegenwart von 1 mM markiert. 10 mM Stammlösungen von Dichlornitrophenol und Pentachlorphenol (beide Aldrich, "gold label") wurden in 90% Ethanol gelöst und die Zellen in der Gegenwart von 0,1 mM markiert.

12.2 Test auf Hemmung der (^{35}S)Sulfatinkorporation

81-04 oder M31 Hybridomazellkulturen in Markierungsmedium (siehe 3.) wurden für 1 Stunde in der An- oder Abwesenheit von 1 oder 0,1 mM potentiell Sulfatierungsinhibitor inkubiert. Nach Zugabe einer Mischung von (^3H)Tyrosin und (^{35}S)Sulfat mit einer Endkonzentration von 1,85 MBq/ml bzw. 18,5 MBq/ml wurde für 8-15 Stunden markiert. Dann wurden die Zellen einmal in eiskaltem PBS gewaschen und die Zellpellets nach Zentrifugation in Lämmli's Probenpuffer durch Kochen lysiert. Nach 10%-SDS-PAGE wurden die Gele fluorographiert. Ein Vergleich des Bandenmusters und der Intensität von Gelbanden mit denen der Kontrolle ergab einen ersten Hinweis, ob eine Substanz zu Proteolyse oder Hemmung der Proteinsynthese führte. Die Gelregion >97 kDa wurde ausgeschnitten und die ^{35}S - als auch die ^3H -Radioaktivität gemessen. Die Messung des (^3H)Tyrosineinbau im Vergleich zur Kontrolle ermöglichte die Quantifizierung eines hemmenden Effektes auf die Proteinsynthese. Das Verhältnis von ^{35}S - zu ^3H -Einbau ermöglichte die Quantifizierung einer Hemmung der (^{35}S)Sulfatinkorporation, die nicht nur durch eine verminderte Proteinsynthese bedingt war.

12.3. Bestimmung von (^{35}S)APS und (^{35}S)PAPS aus Zellen

81-04 wurden für 2 Stunden mit 1.5 MBq/ml (^{35}S)Sulfat wie unter 3.1. beschrieben bei verschiedenen

Chloratkonzentrationen (siehe Abb.7.11.) markiert. Die in PBS gewaschenen Zellen wurden in 50 μ l PBS resuspendiert und sofort für 5 Minuten gekocht. Proteine im Überstand nach 15-minütiger Zentrifugation bei 10000xg wurden durch Aceton präzipitiert und die resultierenden Überstände nach Zugabe von 0,1 μ Mol PAPS und APS (Sigma) durch Dünnschichtelektrophorese bei pH 3,5 (Huttner, 1984) analysiert. Die Positionen von APS und PAPS wurden durch Fluoreszenzdämpfung bei 254 nm auf Cellulosedünnschichtplatten mit Leuchtstoffzusatz (Schleicher und Schüll F1440/LS254) identifiziert. Nach Autoradiographie wurden in den Flecken die APS und PAPS entsprachen die Radioaktivität bestimmt.

13. Immunisierung

2 mg der Fraktion D (siehe Anhang) wurden präparativ auf einem 10% SDS-Gel getrennt. Wie in Abb.A.1. gezeigt, wurden aus dem Coomassie Blau gefärbten Gel gleichgroße Stücke aus dem Zentrum der Hauptbande bei 45 kDa herausgeschnitten (ca 50-100 μ g Protein). Nach Kochen der Gelstücke in 1% SDS, PBS wurde für 18 Stunden auf einem Vibrax-Schüttler bei Raumtemperatur eluiert. Zu dem Eluat wurden vier Volumenanteile Aceton zugegeben und das resultierende Präzipitat nach Zentrifugation in 0,5 ml PBS aufgelöst. Nach Mischen mit 0,5 ml Komplettem Freund'schen Adjuvans (Gibco) durch Passagieren zwischen zwei Spritzen mit engem Verbindungsstück, wurde die Emulsion intradermal in ein weißes, weibliches Neuseeländer Kaninchen appliziert (10 dorsale Injektionen). Für 4 folgende Boosterinjektionen (gleichfalls intradermal) im Abstand von 4-6 Wochen wurde bei gleicher Antigenmenge Inkomplettes Freund'sches Adjuvans (Gibco) verwendet. Das Kaninchen wurde jeweils 6-8 Tage nach den Injektionen zur Blutabnahme an der Ohrvene punktiert. Nach der 4. Boosterinjektion wurde es nach kardialer Punktion total ausgeblutet. Das Präimmunserum und die Antiseren wurden wie in Garvey et al. (1977) beschrieben präpariert, mit 0,1% NaN_3 versetzt und bei -20°C aliquotiert gelagert.

14. Flüssigkeitsszintillationszählungen

14.1. Radioaktivitätsbestimmung in Gelbanden

Radioaktivität in Gelbanden wurde entweder durch Verdau mit 1 ml Pronase oder 1 ml Trypsin (25-100 μ g/ml) in 50 mM Ammoniumbikarbonatpuffer pH 8,5 für 18 Stunden bei 37°C ,

oder durch Behandlung mit 30% Wasserstoffperoxid für 8 Stunden bei 65°C eluiert. Zu Gelstücken und Eluat wurden 10 ml Aqualuma (Baker) gegeben und für mindestens 3 Stunden vor der Zählung auf einem Vibrax-Schüttler gemischt.

14.2. Radioaktivitätsbestimmung in Celluloseplatten

Radioaktive Flecken aus Dünnschichtcelluloseplatten wurden ausgeschnitten und in 10-20 ml Aqualuma für mindestens 5 Stunden vor der Zählung auf einem Vibrax-Schüttler eluiert.

14.3. Zählung von ^{35}S - und ^3H -doppeltmarkierten Proben

^{35}S -Radioaktivität in doppelt markierten Proben wurde in einem Fenster von 475-750 Einheiten gezählt. Der "spill-over" der ^3H -Radioaktivität in dieses Fenster war $>>1\%$. ^3H -Radioaktivität in doppeltmarkierten Proben wurde in einem Fenster von 50-150 Einheiten gezählt. Der "spill-over" der ^{35}S -Radioaktivität in dieses Fenster betrug 4-5%.

14.4. Fluorographie von Gelen

Nach dem Entfärben in 10% Isopropanol, 10% Essigsäure wurden die Gele mit ^3H - und ^{35}S -markierten Proteinen mit 3 Wechseln deionisiertem Wasser für je 15 Minuten gewaschen. Nach 15-minütiger Inkubation mit 0,8 M Natriumsalicylat (Chamberlain, 1979)(Merck), 2% Glycerin wurden die Gele auf Whatman 3MM Filterpapier für 1-2 Stunden bei 65°C unter Vakuum getrocknet. Die getrockneten Gele wurden auf Kodak XR5 Film bei -70°C fluorographiert. Nitrocellulosefilter mit ^{125}J -markierten Proteinen wurden auf Verstärkerfolie (Cronex Dupont) bei -70°C fluorographiert.

E R S T E R T E I L

D a s E n z y m

- (1) Sein erstes Erscheinen in der Evolution
- (2) Seine subzelluläre Lokalisation
- (3) Die Konsensusstruktur im Proteinsubstrat
- (4) Der Einfluß anderer kovalenter Proteinmodifikationen

K A P I T E L 1

DAS VORKOMMEN DER TYROSINSULFATIERUNG VON PROTEINEN

IN VERSCHIEDENEN SPEZIES

EINFÜHRUNG

Die Tyrosinsulfatierung von Proteinen ist eine weitverbreitete Proteinmodifikation, die in einer Vielzahl von Proteinen verschiedener Gewebe einer bestimmten Vertebratenspezies gefunden wird (Huttner, 1982; Hille et al., 1984). Bevor in den folgenden Kapiteln molekulare und zellbiologische Aspekte der Tyrosinsulfatierung untersucht werden, wird in diesem Kapitel versucht, der weiten Verbreitung der Tyrosinsulfatierung einen phylogenetischen Aspekt hinzuzufügen.

Die Untersuchung von Prokaryonten sowie verschiedener Spezies einzelliger und höher organisierter Eukaryonten auf das Vorkommen sulfatierter Tyrosinreste in Proteinen soll helfen die folgenden Fragen zu beantworten, die für das funktionelle Verständnis der Tyrosinsulfatierung wichtig sein könnten:

(1) Wann erschienen in der Evolution erstmals an Tyrosinresten sulfatierte Proteine? Ist ihr Auftreten

korreliert mit der Entwicklung bestimmter Zellorganellen oder höherer Zellorganisationen in der Evolution oder ist die Proteinmodifikation bereits in prokaryontischen Lebewesen vorhanden?

(2) Wie weitverbreitet ist die Tyrosinsulfatierung von Proteinen in der Evolution. Welche gemeinsamen Charakteristika hat die Proteinmodifikation in den verschiedenen Spezies?

(3) Ist es möglich, in den untersuchten Organismen tyrosinsulfatierte Proteine zu identifizieren, die bereits näher charakterisiert worden sind oder gar schon auf genetischem Niveau untersucht wurden? Die Identifizierung solcher Proteine würde es erlauben, die Funktion der Tyrosinsulfatierung an so gefundenen Modellproteinen zu studieren, z.B. durch gentechnologische Methoden.

In diesem Kapitel werden vier weitere Spezies untersucht, die andere Befunde aus dem Labor von Dr. Huttner und aus anderen Labors ergänzen sollen, um ein umfaßenderes Bild des Auftretens der Tyrosinsulfatierung während der Evolution zu gewinnen. Die Ergebnisse sollen dann zu einer Art Stammbaum der Tyrosinsulfatierung zusammenfasst werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Zwei einzellige und zwei mehrzellige Spezies wurden auf das Vorkommen von sulfatierten Tyrosinresten in Proteinen untersucht. Nach in vivo Markierungsversuchen mit radioaktivem Sulfat wurden entweder die ganzen Organismen oder verschiedene Gewebe eines Organismus in SDS homogenisiert und die Proteine auf SDS-Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Einzelne Proteinbanden oder die gesamten Proteine einer bestimmten Molekulargewichtsregion wurden nach ihrer Elution aus dem Gel und alkalischer Hydrolyse durch Dünnschichtelektrophorese auf die Anwesenheit von radioaktivem Tyrosinsulfat untersucht.

In den einzelligen Lebewesen *Paramecium tetraurelia* und *Saccharomyces cerevisiae* konnte nach in vivo Markierung kein Tyrosinsulfat nachgewiesen werden. Nach Injektion von radioaktivem Sulfat in den Mollusken *Arion* spez. (Wegschnecke) konnten in Geweben, Hämolymphe und Schleim Proteine gefunden werden, die an Tyrosinresten sulfatiert waren. In Fliegen von *Drosophila melanogaster* fanden sich nach in vivo Markierung in allen untersuchten Molekulargewichtsregionen an Tyrosin sulfatierte Proteine. Die dabei entdeckte Tyrosinsulfatierung der drei Dotterproteine (Vitellogenine) von *Drosophila melanogaster* wurde eingehender untersucht (siehe Kapitel 5 und Kapitel 6).

Die Aufstellung eines Stammbaumes ergab, daß an

Tyrosinresten sulfatierte Proteine erstmals in der Evolution in eukaryontischen Lebewesen auftraten, wahrscheinlich beim Übergang von einzelligen zu mehrzelligen Organisationsformen.

ERGEBNISSE

1.1. In Hefezellen ist nach Markierung mit (^{35}S)Sulfat kein Tyrosin(^{35}S)sulfat nachweisbar.

Hefezellen wurden bei verschiedenen Konzentrationen von L-Methionin im Medium mit (^{35}S)Sulfat markiert und zelluläre Proteine sowie sekretierte Proteine (nicht gezeigt) durch 10% SDS-PAGE analysiert. Nach Fluorographie (Abb.1.1) war eine Inkorporation von ^{35}S -Radioaktivität in viele Proteinbanden zu beobachten. Die Intensität aber nicht das Muster des radioaktiven Einbaus war von der Konzentration von Methionin im Medium abhängig (Abb.1.1, mittlere Spur). In der Anwesenheit von 0,1 mM Methionin im Medium gab es nahezu keinen Einbau mehr (Abb.1.1., rechte Spur).

Die gesamte Gelspur mit Proteinen, die in der Anwesenheit von 10 μM Methionin markiert wurden (Abb.1.1., mittlere Spur), wurde mit Pronase behandelt und das Eluat einer alkalischen Hydrolyse mit anschließender Neutralisierung unterzogen. Unter dieser Bedingung bleiben Tyrosinsulfat, Methionin, Cystein und Cysteinsäure im Überstand, während alkali-labil gebundenes Sulfat, z.B. an Kohlenhydratresten von Glykoproteinen, hydrolysiert wird und als Bariumsulfat präzipitiert (siehe Huttner, 1984). Nachdem Aliquote des Eluates alkalisch hydrolysiert wurden, fanden sich nach Neutralisierung noch ca 60% der Radioaktivität im Überstand. Aliquote der neutralisierten Überstände wurden durch ein-

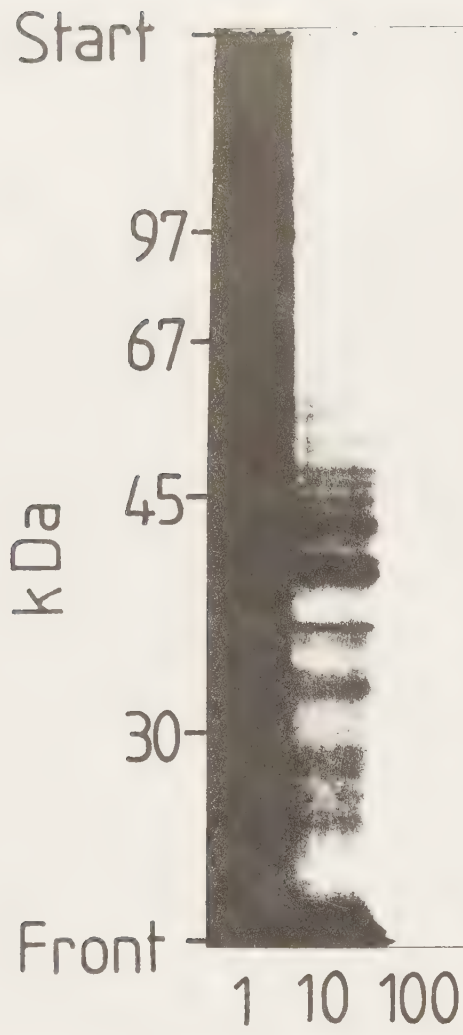
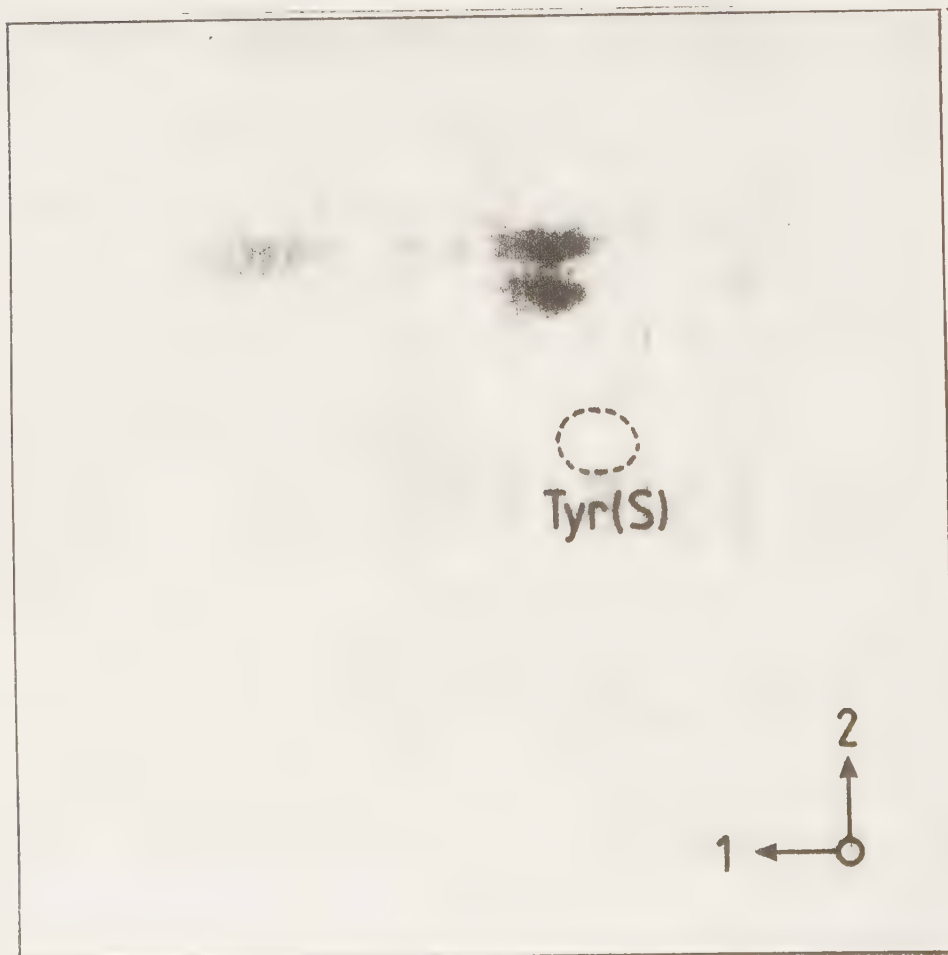


Abb.1.1.: Hefeproteine nach Markierung mit radioaktivem Sulfat bei verschiedenen Konzentrationen von Methionin im Medium. Das Fluorogramm eines reduzierenden 10% SDS-Polyacrylamidgels ist gezeigt. Auf der linken Seite sind die Positionen von Molekulargewichtstandards angezeigt und unter den jeweiligen Gelspuren die Konzentrationen von L-Methionin im Markierungsmedium.

Abb.1.2.: Analyse von markierten Hefezellproteinen auf die Anwesenheit von Tyrosin-[^{35}S]Sulfat. Das Autoradiogramm einer Dünnschichtcelluloseplatte ist gezeigt. Alkalische Hydrolysate von Hefezellproteinen ($10 \mu\text{M}$ Methionin) wurden zweidimensional durch Elektrophorese bei pH 1,9 (1) und pH 3,5 (2) aufgetrennt. Die Position von Tyrosinsulfat wurde nach Ninhydrinfärbung eines komigrierten Standards ($5 \mu\text{g}$) ermittelt und ist durch eine gestrichelte Linie gezeigt (Tyr(S)).



und zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese analysiert. Nach eindimensionaler Elektrophorese (nicht gezeigt) fand sich ein Großteil der ^{35}S -Radioaktivität in der Nähe des Auftragungsortes in einer Position, in der Cystein und Methionin unter diesen Bedingungen migrieren (Huttner, 1984). Nach zweidimensionaler Elektrophorese fand sich ^{35}S -Radioaktivität in der Position von Cysteinsäure (Abb.1.2., oben links) und in zwei nicht identifizierten Flecken. In der Position von Tyrosinsulfat (Abb.1.2., Tyr(S)) war keine Radioaktivität nachweisbar.

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß nach Markierung von Hefezellen mit anorganischem (^{35}S)Sulfat eine Reduktion des Sulfates stattfand, wonach die ^{35}S -Markierung in Methionin- und Cysteinresten von Proteinen eingebaut wird. Ein solcher Stoffwechselweg ist für Hefe, viele Mikroorganismen und für Pflanzen beschrieben worden (siehe Schmidt et al., 1982). Das als Zwischenprodukt der Sulfatreduktion auftauchende "Aktivierte Sulfat", PAPS, kann gleichfalls als Kosubstrat für Sulfatierungsreaktionen verwendet werden (siehe Schmidt et al., 1982). Unter den hier durchgeführten Markierungsbedingungen fand sich jedoch keine Sulfatierung von Tyrosinresten.

1.2. In *Paramaecium*zellen ist nach Markierung mit (^{35}S)Sulfat kein Tyrosin(^{35}S)sulfat nachweisbar.

Proteine von *Paramaecium*zellen wurden nach in

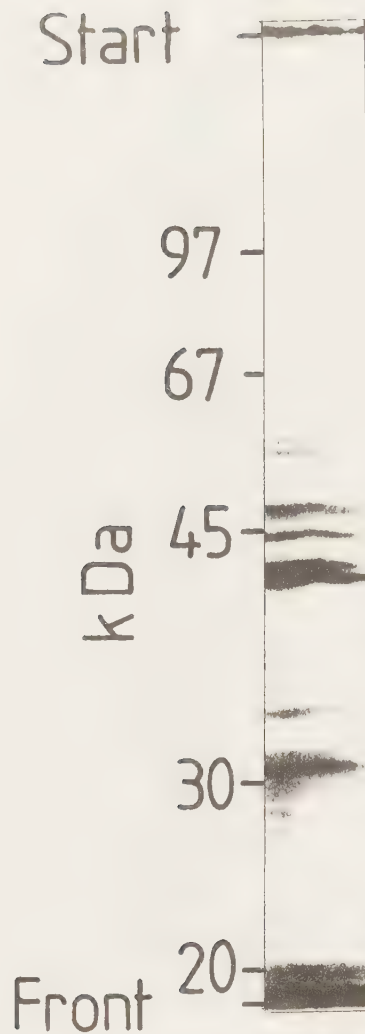


Abb.1.3.: Paramaeciumproteine nach Markierung mit radioaktivem Sulfat. Das Fluorogramm eines reduzierenden 10% SDS-Polyacrylamidgels ist gezeigt. Auf der linken Seite sind die Positionen von Molekulargewichtstandards angegeben.

Abb.1.4.: Analyse von markierten Paramaeciumproteinen auf die Anwesenheit von Tyrosin- ^{35}S Sulfat. Das Autoradiogramm einer Dünnschichtcelluloseplatte ist gezeigt. Alkalische Hydrolysate von Paramaeciumproteinen wurden zweidimensional durch Elektrophorese bei pH 1,9 (1) und pH 3,5 (2) aufgetrennt. Die Position von Tyrosinsulfat wurde nach Ninhydrinfärbung eines komigrierten Standards (5 μg) ermittelt und ist durch eine gestrichelte Linie angegeben (Tyr(S)). Nur die Analyse des mittleren Geldrittels ist abgebildet.



vivo-Markierung mit (^{35}S)Sulfat in der An- oder Abwesenheit von 5 mM Methionin durch SDS-PAGE getrennt und die Gele anschließend fluorographiert (Abb.1.3., ohne Methionin). Die ^{35}S -Markierung fand sich in sehr vielen Proteinbanden, deren Muster dem nach Färbung mit Coomassie Blau (nicht abgebildet) ähnlich war. Nach Markierung in der Anwesenheit von 5 mM Methionin im Medium fand nahezu keine Inkorporation von ^{35}S in Proteine mehr statt (nicht abgebildet).

Eine Gelspur wurde in drei gleichgroße Teile geschnitten und die Proteine nach Elution mit Pronase alkalisch hydrolysiert. Die Überstände der neutralisierten Hydrolysate wurden durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese analysiert (Abb.1.4.) Auch in den Proteinen dieses Organismus war kein radioaktiv markiertes Tyrosinsulfat nachweisbar (Abb.1.4., Tyr(S)).

Die Ergebnisse legen nahe, daß auch in dem Protozoon *Paramecium tetraurelia* ein Großteil der (^{35}S)Sulfat-Markierung als (^{35}S)Methionin und (^{35}S)Cystein in Proteine inkorporiert wurde, was auf die Existenz eines sulfat-reduzierenden Stoffwechselweges hindeutet.

1.3. Tyrosinsulfatierung ist eine häufige Modifikation in dem Mollusken *Arion* spez.

Nach Injektion von (^{35}S)Sulfat in die Wegschnecke *Arion* spez. wurden verschiedene Gewebe und Körperflüssigkeiten

gesammelt, in SDS homogenisiert und deren Proteine durch SDS-PAGE und anschließende Fluorographie analysiert. Die in Abb.1.5. (linke Hälfte) gezeigten Gewebe Muskel, Darm und Lunge sowie der Schleim, zeigten unterschiedliche Muster von ^{35}S -markierten Proteinen, die von den Proteinmustern nach Färbung mit Coomassie Blau sehr unterschiedlich waren (Abb.1.5., rechte Hälfte). Den spezifischen Markierungsmustern gemeinsam war eine starke Markierung im oberen Molekulargewichtsbereich, wie sie für sulfatierte Proteoglykane typisch ist (siehe z.B. Dunham und Hynes, 1978). Fünf verschiedene radioaktive Banden (siehe Pfeile in Abb.1.5.) wurden ausgeschnitten, die Proteine mit Pronase eluiert und die Eluate alkalisch hydrolysiert. Die neutralisierten Überstände wurden durch eindimensionale Dünnschichtelektrophorese analysiert. In allen fünf untersuchten Proteinen war die inkorporierte ^{35}S -Radioaktivität teilweise als Tyrosin(^{35}S)sulfat nachweisbar (Abb.1.6.). Im Auftragungsort wo Methionin und Cystein nach pH3,5-Elektrophorese zu finden sind (Huttner, 1984), war keine Markierung nachweisbar (Abb.1.6., Auftragungsort).

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß in dem untersuchten Mollusken nach Markierung mit (^{35}S)Sulfat keine Sulfatreduktion stattfand, da weder radioaktives Methionin noch Cystein nachweisbar waren. Die Markierung von Proteinen resultierte aus einer kovalenten Verknüpfung von (^{35}S)Sulfat mit Kohlenhydrat- und Tyrosinresten von

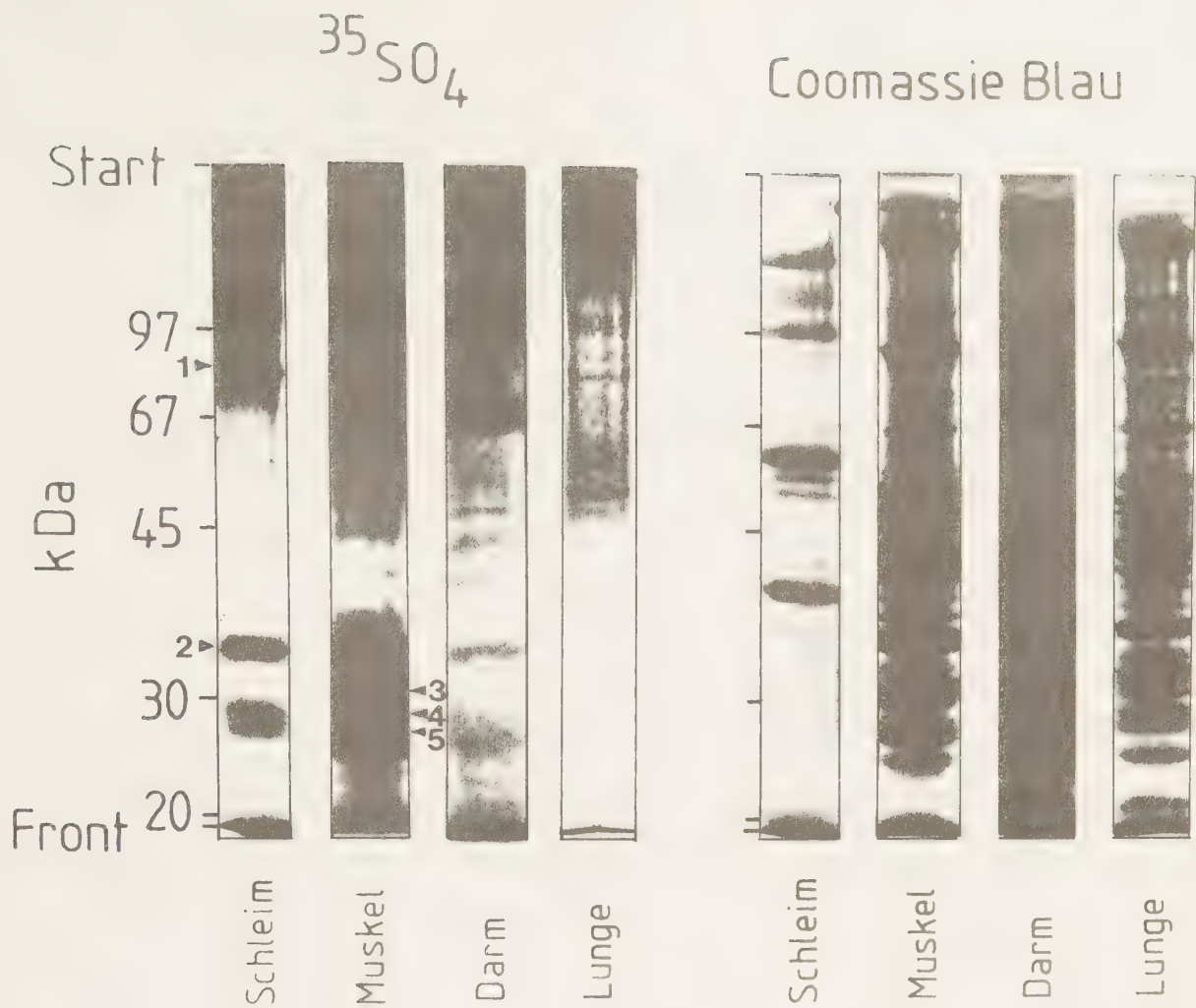


Abb.1.5.: [^{35}S]Sulfatmarkierung verschiedener Gewebe der Wegschnecke Arion. Fluorogramme ($^{35}\text{SO}_4$) sowie die Proteinfärbung (Coomassie Blau) eines reduzierenden 10% SDS-Polyacrylamidgels sind gezeigt. Auf der linken Seite der Fluorogramme und der proteingefärbten Gelspuren sind die Positionen von Molekulargewichtstandards angezeigt. Die Pfeile mit den Zahlen weisen sulfatierte Proteinbanden aus, deren Analyse auf die Anwesenheit von Tyrosin- ^{35}S Sulfat in Abb.1.6. gezeigt ist. Es ist nur eine Auswahl der untersuchten Gewebe abgebildet.

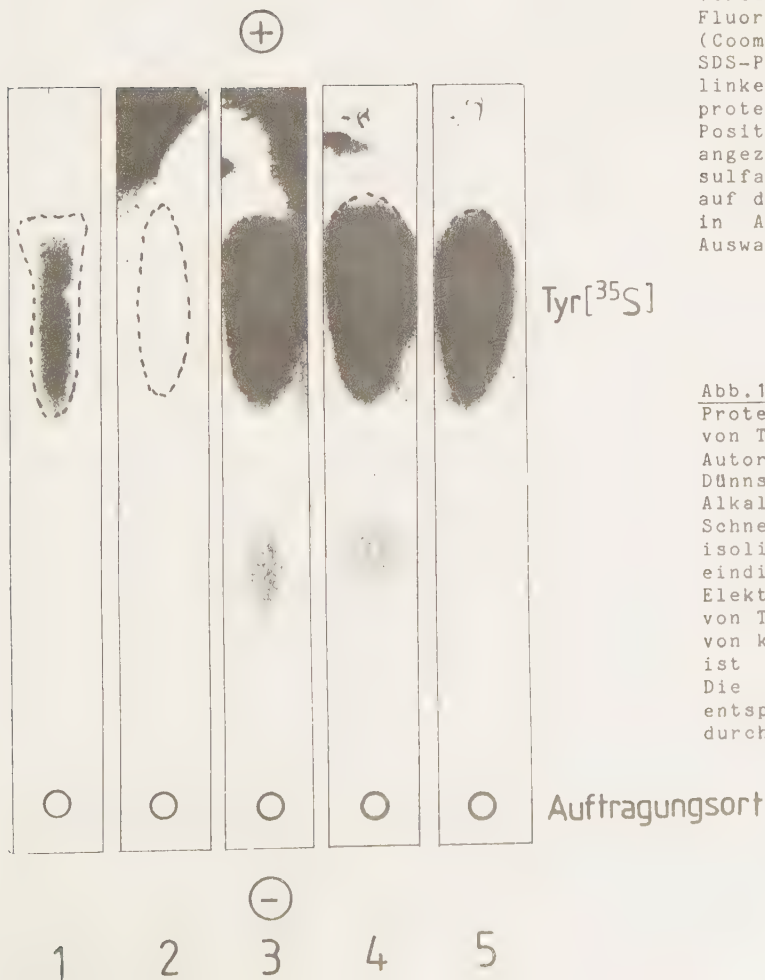


Abb.1.6.: Analyse von fünf sulfatmarkierten Proteinen der Wegschnecke auf die Anwesenheit von Tyrosin- ^{35}S Sulfat.

Autoradiogramme von Dünnschichtcelluloseplatten sind abgebildet. Alkalische Hydrolysate von sulfatmarkierten Schneckenproteinen, die durch SDS-PAGE isoliert wurden (siehe Abb.1.5.), wurden eindimensional bei pH 3,5 durch Elektrophorese analysiert. Die Positionen von Tyrosinsulfat wurde nach Ninhydrinfärbung von komigriertem Standard ($5\text{ }\mu\text{g}$) bestimmt und ist durch eine gestrichelte Linie angezeigt. Die Zahlen unter den einzelnen Spuren entsprechen den Proteinen, die in Abb.1.5. durch Pfeile markiert sind.

Proteinen. Die untersuchten tyrosinsulfatierten Proteine waren z.T. für die einzelnen Gewebe spezifisch.

1.4. Tyrosinsulfatierung ist eine häufige Modifikation in *Drosophila melanogaster*.

Nach in vivo-Markierung von *Drosophila* Fliegen durch Fütterung von (^{35}S)Sulfat wurden ganze Fliegen in SDS homogenisiert, die gesamten Proteine mit Aceton präzipitiert und anschließend alkalisch hydrolysiert. Die Überstände nach Neutralisierung der Hydrolysate wurden durch eindimensionale Dünnschichtelektrophorese bei pH 3,5 analysiert. 21% des gesamten proteingebundenen (^{35}S)Sulfates wurden als Tyrosin(^{35}S)sulfat wiedergefunden, während 77% hydrolysiert und als Barium(^{35}S)sulfat präzipitiert wurden. Nach pH 3,5-Elektrophorese (Huttner, 1984) waren im Auftragungsort weder Methionin noch Cystein auffindbar (nicht abgebildet, vgl. Abb.4.5.). Wenn Fliegen in vivo mit (^{35}S)Methionin markiert und die Proteine durch zweidimensionale Gele getrennt wurden, ergab sich nach Fluorographie ein Muster, das sehr unterschiedlich von dem nach (^{35}S)Sulfatmarkierung war (Abb.1.7.). In allen untersuchten Molekulargewichtsbereichen konnte proteingebundenes Tyrosinsulfat nachgewiesen werden (siehe Kapitel 5, Abb.5.1.).

Wenn Proteine männlicher und weiblicher Fliegen separat durch SDS-PAGE und anschließende Fluorographie analysiert

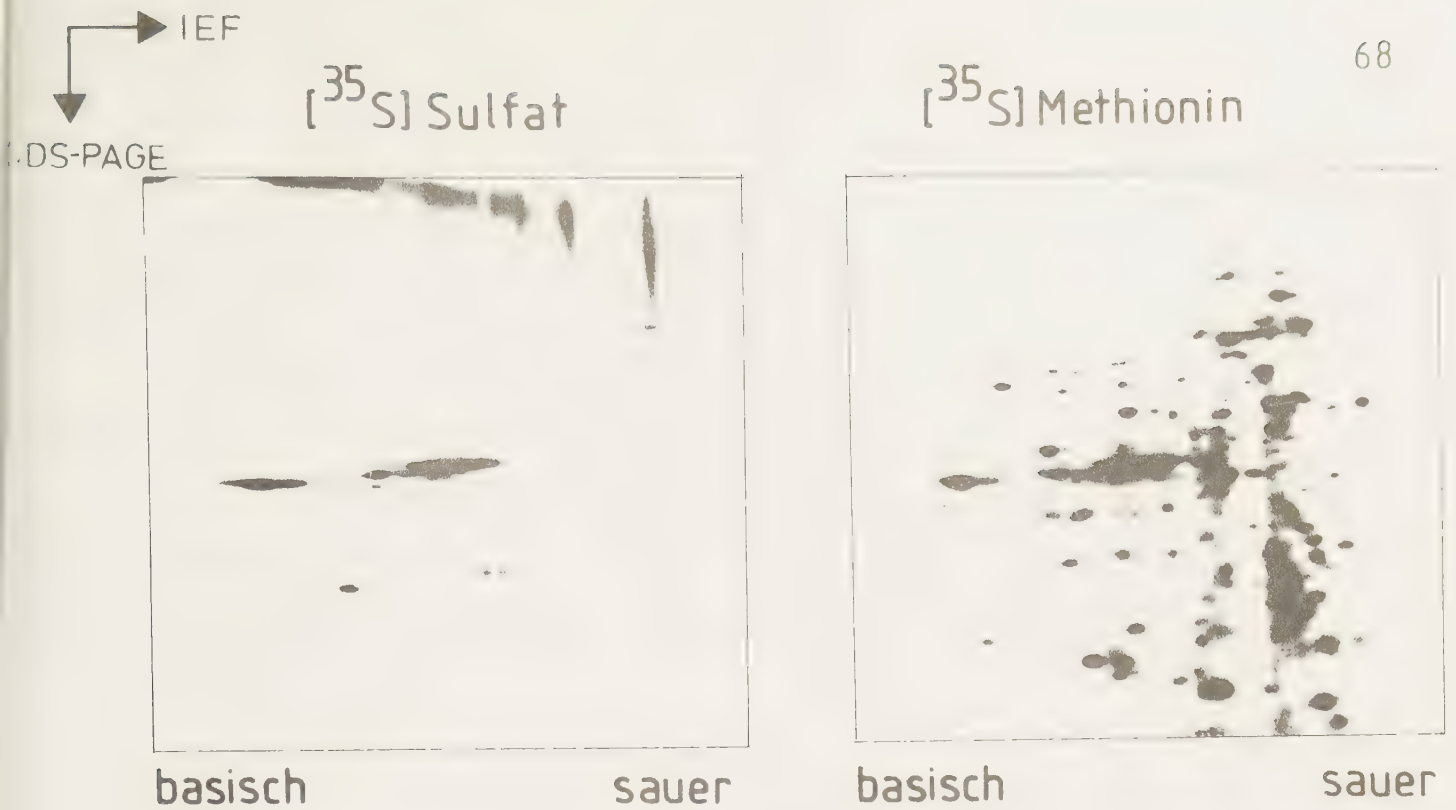


Abb.1.7.: Zweidimensionale Gelelektrophorese von $[^{35}\text{S}]$ Sulfat- bzw. $[^{35}\text{S}]$ Methionin-markierten Proteinen von *Drosophila* Fliegen. Fluorogramme zweidimensionaler Gele sind abgebildet. Die Pfeile links oben geben die jeweilige Dimension an in der die Proteine isoelektrofokussiert (IEF) bzw. durch reduzierende SDS-PAGE getrennt wurden.

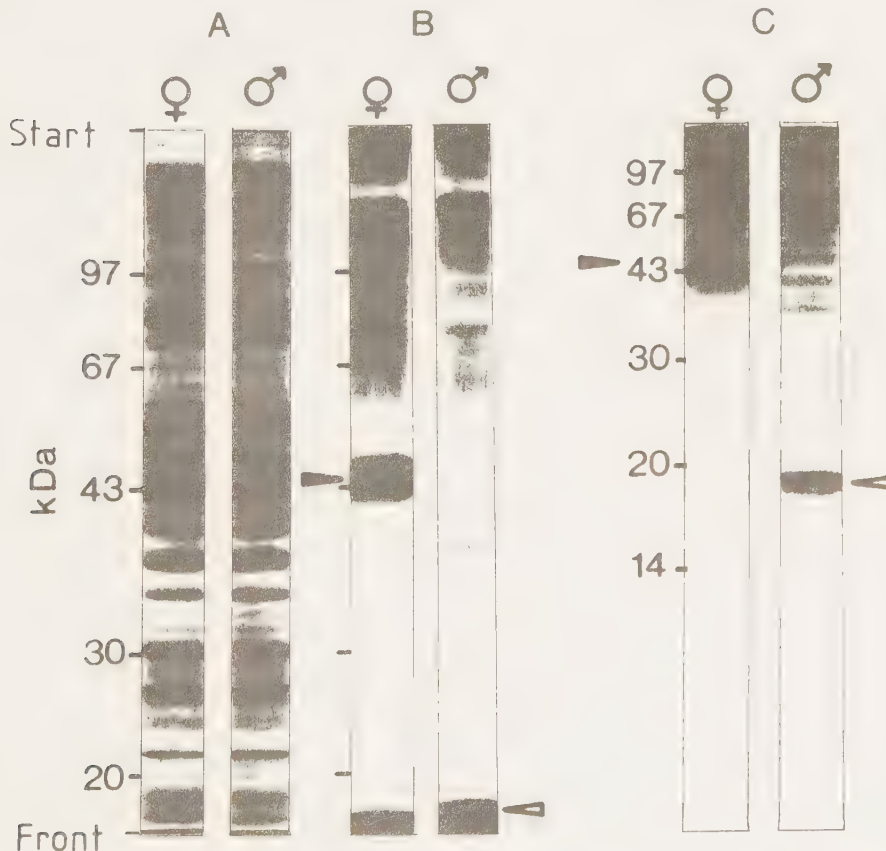


Abb.1.8.: Geschlechtsspezifische Sulfatierungsmuster in Fliegen von *Drosophila melanogaster*. Fluorogramme von reduzierenden 10%- (B) und 15%-SDS-Polyacrylamidgelen (C) sind gezeigt. Die Proteinfärbung des 10% SDS-Geles ist in A für weibliche und männliche Fliegen gezeigt. Auf der linken Seite der Gelspuren sind die Positionen von Molekulargewichtstandards angegeben. Die ausgefüllten Pfeile zeigen die Position weibchenspezifischer, sulfatierter Proteine und die nicht ausgefüllten Pfeile die Position männchenspezifischer Proteine in den Fluorogrammen der 10%- (B) bzw. 15%-SDS-Gele (C).

(Abb.1.8.) wurden, zeigten sich deutliche geschlechtsspezifische Unterschiede in der Präsenz sulfatierter Banden (Abb.1.8., Pfeile). Für weibliche Fliegen waren Proteine mit Molmassen um 45 kDa spezifisch, für männliche Fliegen ein oder mehrere Proteine mit einer Molmasse von 19 kDa. Die weibchenspezifischen tyrosinsulfatierten Proteine werden in Kapitel 5 eingehend untersucht.

Fliegen wurden mit (^3H)Tyrosin markiert und das Verhältnis von (^3H)Tyrosinsulfat zu (^3H)Tyrosin im gesamten Protein der Fliegen nach alkalischer Hydrolyse und anschließender Analyse der Aminosäuren durch Dünnschichtelektrophorese bestimmt. Es wurde gefunden, daß im Durchschnitt 1% aller Tyrosinreste in weiblichen und 0,4% aller Tyrosinreste in Proteinen männlicher Fliegen sulfatiert vorlagen. Esterifizierung mit Sulfatresten ist wahrscheinlich die häufigste kovalente Modifizierung von Tyrosinresten in Proteinen von *Drosophila melanogaster*.

DISKUSSION

1.1. Sulfatmarkierung in sulfatreduzierenden Organismen

Nach Markierung der Mikroorganismen *Paramecium* und *Saccharomyces* mit anorganischem (^{35}S)Sulfat wurden eine große Zahl von Polypeptiden mit ^{35}S markiert. Folgende Beobachtungen sprechen dafür, daß diese Markierung zum Großteil nicht durch den Einbau von radioaktivem Sulfat, sondern durch den Einbau von (^{35}S)Methionin und (^{35}S)Cystein bedingt war: (1) die Präsenz von ^{35}S -Markierung in den Positionen von Methionin, Cystein und Cysteinsäure nach Dünnschichtelektrophorese alkalischer Hydrolysate, (2) die starke Reduktion des ^{35}S -Einbaus in der Gegenwart von Methionin (und Cystein) im Medium und (3) die ^{35}S -Markierung von nahezu jedem Protein, das mit Coomassieblaufärbung sichtbar war.

In aeroben Mikroorganismen und Pflanzen existiert ein Stoffwechselweg, der Sulfat über ein NADPH-gekoppeltes Reduktasesystem zu Sulfit und dann weiter zu Sulfid reduziert, das dann mit O-Acetylserin zu Cystein kondensiert (siehe Schmidt et al., 1982). Cystein kann dann zu Methionin umgewandelt werden (siehe Finkelstein und Martin, 1984; Livesey, 1984). Der radioaktive Schwefel in (^{35}S)Sulfat kann demzufolge in Proteinen als (^{35}S)Cystein und (^{35}S)Methionin wieder erscheinen. Als erster Schritt in der Sulfatreduktion wird Sulfat zu PAPS aktiviert.

Sulfatierende Enzyme müssen mit sulfatreduzierenden Enzymen um dieses Substrat konkurrieren.

Wie hier gezeigt ist, ist es sehr schwierig in sulfatreduzierenden Organismen Proteinsulfatierung durch Markierung mit (^{35}S)Sulfat nachzuweisen, da zum einen ein Stoffwechselweg beständig radioaktives Sulfat reduziert und für die Synthese von Aminosäuren verbraucht und zum anderen der dadurch entstehende Hintergrund aus (^{35}S)Methionin und (^{35}S)Cystein markierten Proteinen die Aufspürung sulfatierter Proteine durch Fluorographie erschwert. Um diese Probleme zu überwinden, wurden Zellen in der Anwesenheit von Methionin (und Cystein) im Medium markiert. Unter dieser Bedingung besteht im Organismus kein Bedarf Sulfat zur Synthese von Aminosäuren zu reduzieren, da für die Beladung der entsprechenden transfer-RNAs genug unmarkiertes Methionin und Cystein bereitstehen. Aktiviertes Sulfat, PAPS, sollte demnach für Sulfotransferasereaktionen zur Verfügung stehen. Gleichzeitig sollte der Hintergrund aus (^{35}S)Methionin- und (^{35}S)Cystein-markierten Proteinen zurückgehen. In der Tat ließ sich in der Anwesenheit von Methionin und Cystein im Medium ein drastischer Rückgang des Einbaus von ^{35}S -Radioaktivität in Proteine erzielen. Unter dieser Bedingung blieben jedoch keine Proteinbanden bei Hefe- und Paramaeciumzellen selektiv markiert, sondern das gesamte Bandenmuster ging gleichmäßig in seiner radioaktiven Intensität zurück. Wenn Proteine der Mikroorganismen unter

diesen Bedingungen durch alkalische Hydrolyse, gefolgt von Dünnschichtelektrophorese untersucht wurden, war kein radioaktives Tyrosinsulfat nachweisbar. Demzufolge scheint Proteinsulfatierung an Tyrosin in *Paramecium* und *Saccharomyces* eine sehr seltene, wenn überhaupt vorhandene kovalente Modifikation zu sein.

Wenn Fliegen von *Drosophila melanogaster* in der Abwesenheit von Methionin durch Fütterung von (^{35}S)Sulfat markiert wurden, war Sulfatreduktion zu beobachten (nicht abgebildet), die mit großer Wahrscheinlichkeit durch Mikroorganismen im Darm der Fliegen verursacht wurde. (Die Fliegen wurden durch Fütterung von Hefe angezogen). In der Anwesenheit von Methionin im Futter war keine Sulfatreduktion zu beobachten. Alle inkorporierte ^{35}S -Radioaktivität war entweder als Kohlenhydratsulfatierung oder als Tyrosinsulfatierung nachweisbar.

1.2. Das Auftreten der Tyrosinsulfatierung in der Evolution

In dem sulfatreduzierenden Prokaryonten *Escherichia coli* (Benedum und Huttner, unpubliziert) und in dem sulfatreduzierenden Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Stadler et al., 1983) war Tyrosinsulfatierung von Proteinen nicht nachweisbar. In der sulfatreduzierenden, mehrzelligen Grünalge *Volvox carteri* fanden sich jedoch tyrosinsulfatierte Proteine (Wenzl, Sumper und Huttner, unpubliziert; Wenzl und Sumper, 1986). Das Vorkommen von

Tyrosinsulfatierung korreliert demnach nicht mit dem Vorkommen von Sulfatreduktion in einem Organismus.

In den Insekten *Drosophila melanogaster* (Kapitel 1 und 5) und *Leucophaea maderae* (Küchenschabe) (Nachman et al., 1986) sind tyrosinsulfatierte Proteine nachweisbar. In dem Anneliden *Hirudo medicinalis* (Blutegel) wurde gefunden, daß das blutgerinnungshemmende Peptid Hirudin an Tyrosin sulfatiert ist (Petersen et al., 1976). In allen Vertebraten, die bisher studiert wurden, konnte Tyrosinsulfatierung von Proteinen beobachtet werden (siehe Tab.E1). Wenn die hier aufgeführten Befunde in einen Stammbaum der Arten eingetragen werden (Abb.1.9), ergibt sich, daß während der Evolution tyrosinsulfatierte Proteine erstmals in eukaryontischen Organismen auftraten. Da nur eukaryontische Zellen spezialisierte Endomembransysteme entwickelt haben, ist es denkbar, daß Enzyme, die Tyrosinreste in Proteinen sulfatieren als spezifische Komponenten eines Endomembransystems entstanden sind. Unter den eukaryontischen Organismen, die die Modifikation bereits besitzen, sind nur vielzellige Organismen, die bereits differenzierte und polarisierte Zellen haben. Der am niedrigsten organisierte Organismus, in dem Tyrosinsulfatierung von Proteinen bisher gefunden wurde, ist die Grünalge *Volvox carteri* (Wenzl und Sumper, 1986). Dieses Lebewesen besteht aus zwei Zelltypen (vegetative und somatische Zellen), deren Verband eine Hohlkugel bildet. Damit tauchte in der Evolution wahrscheinlich erstmals ein

interner Hohlraum in einem Vielzeller und damit die Notwendigkeit auf, sekretorische Proteine in das richtige Kompartiment (innerer Hohlraum oder Zelläußeres) zu sekretieren. Es ist denkbar, daß hier die Tyrosinsulfatierung als eine kovalente Modifikation sekretorischer Proteine erstmals in der Evolution einen Selektionsvorteil bot, der es mit ermöglicht hat, Zellverbände höher zu organisieren.

Die Konservierung und Abundanz der Tyrosinsulfatierung in Höheren Lebewesen deutet auf eine wichtige biologische Funktion dieser Proteinmodifikation hin.

K A P I T E L 2

DIE SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER TYROSINSULFATIERUNG
VON PROTEINEN

EINFÜHRUNG

Der Befund, daß alle bisher identifizierten tyrosinsulfatierten Proteine sekretorische Proteine sind (siehe Tab.E2), deutet darauf hin, daß die Tyrosinsulfatierung in einem oder mehreren der Kompartimente auftritt, durch die sekretorische Proteine transportiert werden, bevor sie die Zelle verlassen (siehe Abb.2.1.). Zu diesen Kompartimenten gehören das rauhe Endoplasmatische Retikulum (rER) - die Organelle, an der die sekretorischen Proteine synthetisiert und gegebenenfalls N-glykosyliert werden -, die drei Subkompartimente des Golgi Apparates, der cis, mediale und trans Golgi und die sekretorischen Vesikel, durch deren Fusion mit der Plasmamembran die sekretorischen Proteine schließlich in das Medium gelangen (siehe Farquhar, 1985). Während dieser Promotionsarbeit wurde gefunden (Lee und Huttner, 1985), daß ein Tyrosinreste sulfatierendes Enzym in einem Homogenat von Nebennierenmarkgewebe in Golgimembranvesikeln angereichert und mit seinem aktiven Zentrum in das Lumen der Vesikel gerichtet ist. Dieser Befund und die Beobachtung, daß alle sekretorischen Proteine auf ihrem Weg zur Zelloberfläche durch den Golgi Apparat

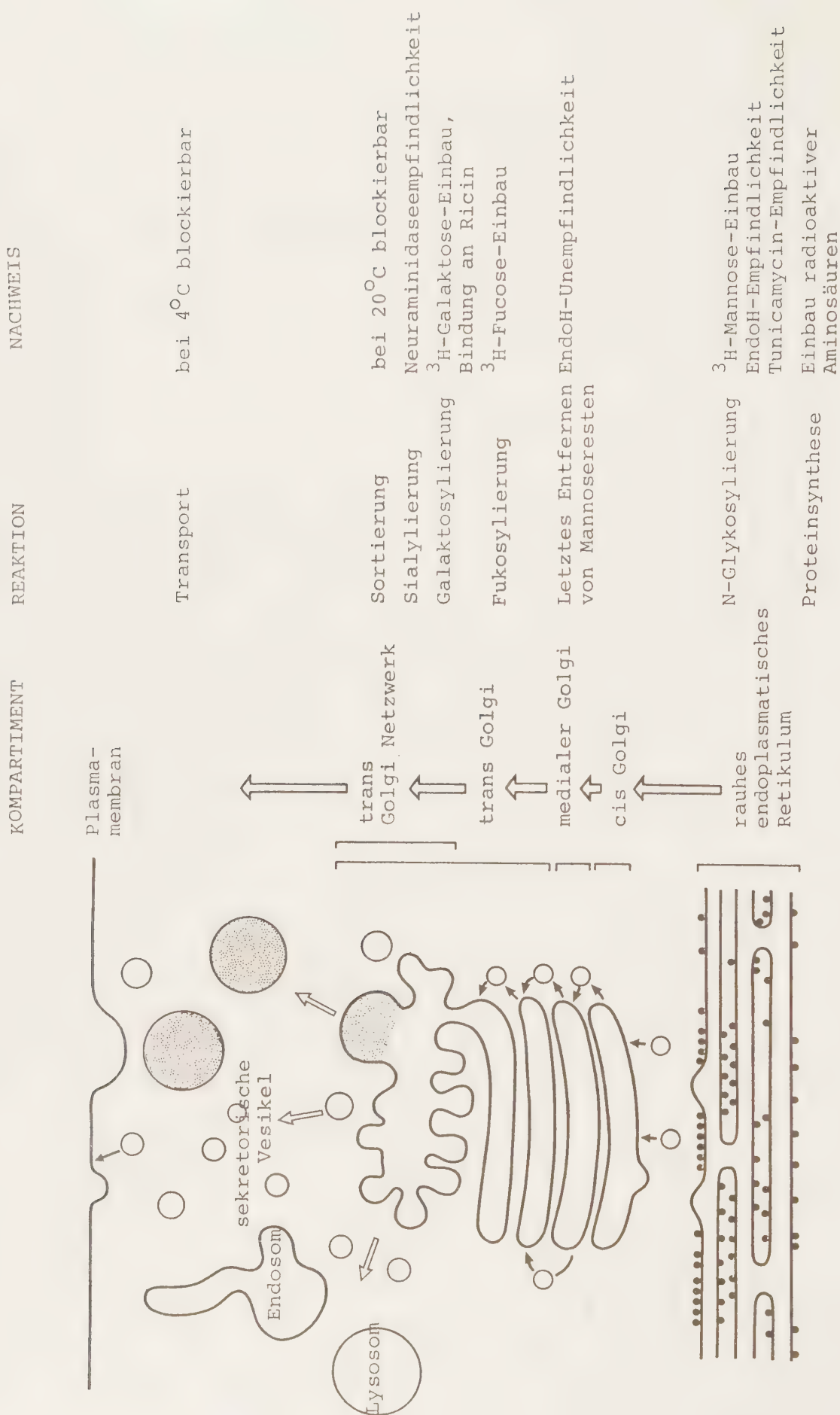


Abb.2.1.: Die Lokalisation von Proteinmodifikationen in den sekretorischen Kompartimenten und ihr spezifischer Nachweis. Nähere Erläuterungen siehe Einleitung und Diskussion von Kapitel 2.

geschleust werden (siehe Farquhar, 1985), legen daher nahe, daß die Tyrosinsulfatierung sekretorischer Proteine im Golgi Apparat lokalisiert ist.

Eine Hauptfunktion des Golgi Apparates ist es, Proteine, die für die Lysosomen, sekretorischen Granula, die Plasmamembran, den extrazellulären Raum oder den Golgi Apparat selbst bestimmt sind, kovalent zu modifizieren (siehe Dunphy und Rothman, 1985; Kornfeld und Kornfeld, 1985; Farquhar, 1985). Besonders gut untersucht sind solche enzymatischen Reaktionen im Golgi Apparat, die zur weiteren Modifizierung von N-gebundenen Oligosacchariden führen, die kotranslational im rER an Proteine gebunden wurden. Diese Reaktionen beinhalten (1) das spezifische Entfernen von Kohlenhydratresten von N-gebundenen Oligosacchariden, (2) das Anhängen neuer Kohlenhydratreste und (3) das Anhängen von Resten an N-gebundene Oligosaccharide, die anderer Natur als Kohlenhydrate sind, z.B. Sulfat und Phosphat (siehe Hubbart und Ivatt, 1981; Farquhar, 1985). Neu synthetisierte Proteine werden an der cis-Seite des Golgi Apparates aufgenommen und vektoriell durch das mediale Kompartiment bis zur trans-Seite transportiert, von wo sie den Golgi Apparat verlassen (siehe Abb.2.1., siehe Griffiths und Simons, 1986). Verglichen mit dem Kenntnisstand über die Lokalisation der Prozessierungsreaktionen von N-gebundenen Oligosacchariden in den Subkompartimenten des Golgi Apparates ist nur wenig über die spezifische Lokalisation von Modifizierungsreaktionen an primären

Aminosäuren von Proteinen im Golgi Apparat bekannt.

In diesem Kapitel wird die Sulfotransferaseaktivität, die für die Tyrosinsulfatierung der Schwere Kette des IgM verantwortlich ist, im trans Kompartiment des Golgi Apparates lokalisiert. Dieses Kompartiment des Golgi Apparates, das im Elektronenmikroskop zum Teil als ein Netzwerk von Röhren, Zisternen und Vesikeln erscheint, hat kürzlich besondere Aufmerksamkeit gefunden. Es wird angenommen, daß diese Strukturen eine funktionelle Einheit bilden, bezeichnet als trans Golgi-Netzwerk, dem eine Schlüsselrolle bei der Sortierung von lysosomalen, Plasmamembran- und sekretorischen Proteinen in spezifische Membrantransportvesikel zukommt (siehe Griffiths und Simons, 1986). Der Befund, daß Tyrosinsulfatierung eine der letzten Modifikationen ist, mit der Proteine versehen werden, bevor sie im trans Golgi Netzwerk aussortiert werden, könnte helfen, die molekularen Mechanismen des Aussortierungsprozesses besser zu verstehen.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Schwere Kette von sekretiertem Immunglobulin M (IgM), das in einer Maushybridomazelllinie (81-04) untersucht wurde, war sulfatiert. Zwei Drittel des eingebauten Sulfates waren als Tyrosinsulfat nachweisbar. Ein Drittel war an N-gebundene Kohlenhydratreste des Proteins gebunden. Die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung betrug mindestens 1 Mol pro Mol 19S IgM.

Das Vorkommen von Tyrosinsulfat in IgM, einem N-glykosylierten Protein, erlaubte einen Vergleich des Sulfatierungszustandes mit dem Prozessierungsgrad von N-gebundenen Kohlenhydraten in der Schwere Kette von intrazellulärem IgM. Dies wurde benutzt, um die subzelluläre Lokalisierung der Tyrosinsulfatierung innerhalb der sekretorischen Kompartimente genau zu bestimmen.

Die verschiedenen intrazellulären Formen der Schwere Kette des IgM konnten zwei Gruppen zugeordnet werden mit durchschnittlichen, apparenten Molmassen von 71 kDa und 76 kDa. Durch Puls-Chase-Markierung ließ sich zeigen, daß die 71 kDa-Form eine Vorläuferform der 76 kDa-Form war. Die 71 kDa-Form repräsentierte diejenigen Formen, welche sich zwischen rauhem Endoplasmatischem Retikulum und Medium-Golgi Kompartiment abfanden. Die 76 kDa-Form der Schwere Kette befand sich zwischen dem Trans-Golgi Kompartiment und der Zelloberfläche und wurde konstitutiv in das Medium sekretiert. Nur die 76 kDa-Form inkorporierte radioaktives

Sulfat.

In Pulsmarkierungsexperimenten, in denen Hybridomazellen mit Galaktose und Sulfat doppel-markiert wurden, erschienen die zwei unterschiedlichen Markierungen der Schweren Kette des IgM mit identischen Kinetiken im Medium. Nach Pulsmarkierung mit Sulfat für vier Minuten wurde gefunden, daß sich das mit Sulfat markierte IgM bereits an das Galaktose-spezifische Lectin Ricin binden ließ und gegenüber einer Neuraminidasebehandlung empfindlich war. Diese Resultate zeigen, daß die Sulfatierung während oder kurze Zeit später auftritt, als zwei trans Golgi-spezifische Modifikationen, nämlich das Anhängen von Galaktose (Roth und Berger, 1985) und das von Sialinsäure (Roth et al., 1985; Geuze et al., 1985) an N-gebundene Kohlenhydrate. IgM, das in Zellysaten mit (^{35}S)PAPS sulfatiert wurde, ließ sich ebenfalls an Ricin-Agarose binden und war empfindlich gegenüber einer Neuraminidasebehandlung. Dies spricht dafür, daß die Sulfotransferaseaktivitäten in dem gleichen Kompartiment lokalisiert waren, wie IgM, das bereits trans Golgi-spezifische Modifizierungen erhalten hatte. Die Versuchsbedingungen wurden dabei so gewählt, daß Transportvorgänge zwischen verschiedenen Vesikeln nicht mehr stattfinden konnten. In Pulsmarkierungsexperimenten bei 20°C, einer Temperatur, bei der virale Membranproteine auf ihrem Weg zur Zelloberfläche im Trans-Golgi Netzwerk angehäuft werden (Matlin und Simons, 1983; Saraste und Kuismanen, 1984), wurde die Schwere Kette des IgM immer noch

sulfatiert, aber IgM erschien nicht mehr im Medium. Dieser Effekt war reversibel, da bei 20°C markiertes IgM bei 37°C wieder sekretiert wurde.

Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß beides, die Tyrosinsulfatierung und die Sulfatierung an Kohlenhydratresten der Schweren Kette des IgM, im gleichen subzellulären Kompartiment stattfinden und daß dieses Kompartiment dem Trans-Golgi Netzwerk entspricht.

Eine Analyse des Zeitverlaufs der Sekretion von mit Sulfat pulsmarkiertem IgM durch eine semilogarithmische Auftragung ergab, daß der Transport von markiertem IgM vom Trans-Golgi Netzwerk zur Zelloberfläche einer Kinetik Erster Ordnung folgte. Dies deutet auf die Existenz eines limitierenden Transportschrittes zwischen dem Ort der Sulfatierung und der Zelloberfläche hin.

ERGEBNISSE

2.1 Die Schwere Kette des Immunoglobulins M von 81-04 Zellen inkorporiert (^{35}S)Sulfat.

Zellkulturen der Hybridomazelllinie 81-04 wurden entweder mit (^3H)Tyrosin oder (^{35}S)Sulfat markiert und intrazelluläres sowie sekretiertes IgM durch Erkennung der Leichten Kette mit Anti-Maus-IgG-Agarose immunoaffinitätsgereinigt. IgM wurde durch SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen auf 4% Gelen (nicht abgebildet) und unter reduzierenden Bedingungen auf 10% Gelen analysiert, gefolgt von Fluorographie (Abb.2.2.). Unter nicht reduzierenden Bedingungen hatte tyrosin-markiertes IgM aus Zellen und Medium eine langsamere Mobilität im SDS-Gel als die des Thyreoglobulin Dimers (669 kDa), was zeigt, daß in der hier studierten Zelllinie IgM hauptsächlich in der pentameren 19S-Form (10 Schwere und 10 Leichte Ketten, eine J-Kette; siehe Tartakoff et al., 1979) vorliegt. Unter reduzierenden Bedingungen wurden zwei intrazelluläre Formen der Schweren Kette des IgM mit apparenten Molmassen von 71 und 76 kDa (Abb.2.2., fünfte Spur) gefunden. Im Medium erschien die Schwere Kette als eine diffuse Bande mit einer mittleren Molmasse von 76 kDa (Abb.2.2., sechste Spur). Zwei Varianten der Leichten Kette wurden in Zellen sowie im Medium beobachtet mit apparenten Molmassen von 26 und 28 kDa (Abb.2.2., fünfte und sechste Spur). In einer Analyse der

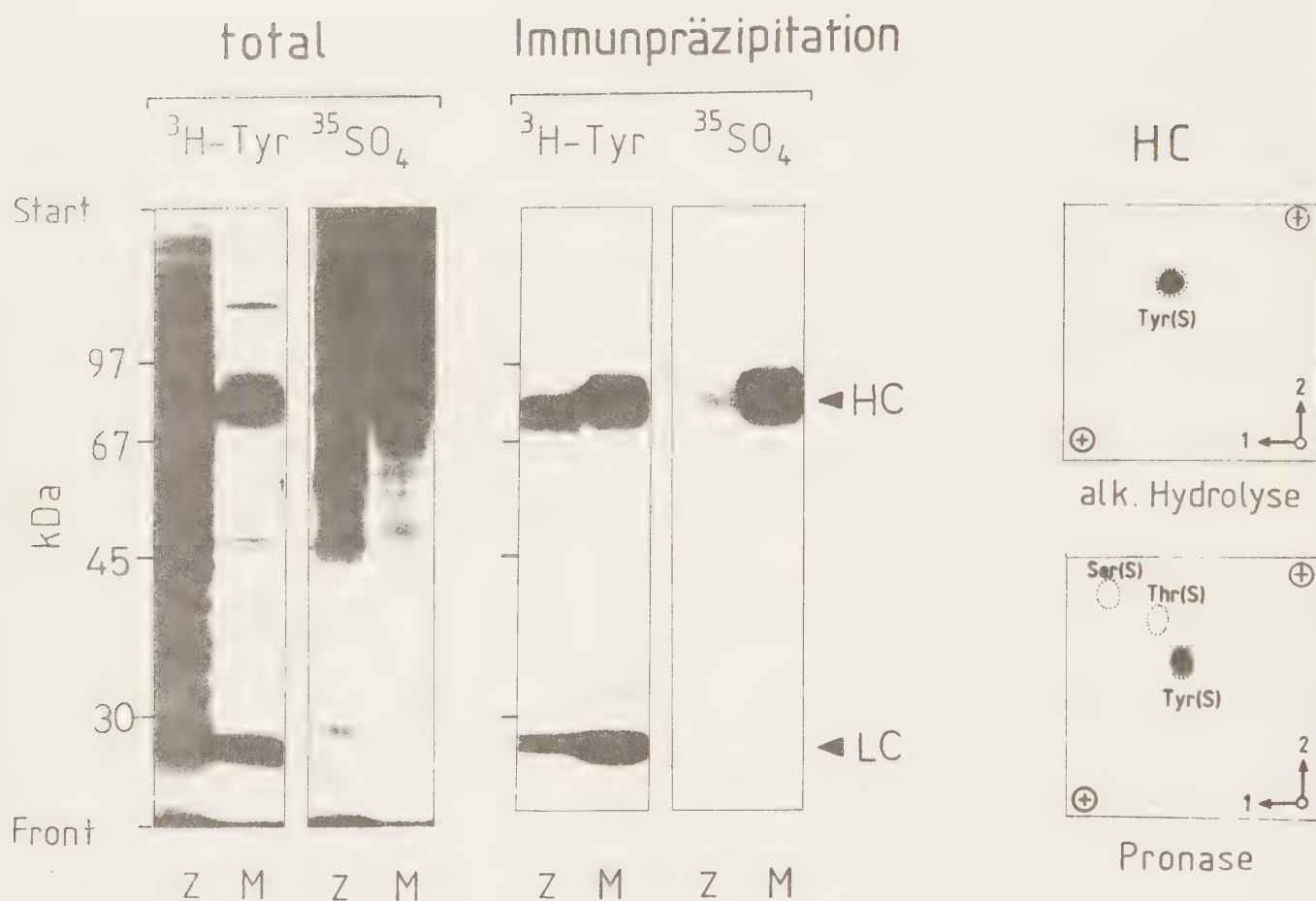


Abb. 2.2.: Tyrosinsulfatierung der Schweren Kette im Immunglobulin M von 81-04 Zellen.

Zellkulturen wurden entweder mit (^3H)Tyrosin ($^3\text{H-Tyr}$) oder (^{35}S)Sulfat ($^{35}\text{SO}_4$) markiert. Aliquote von Gesamtprotein und immunopräzipitiertem IgM aus Zellen (Z) und Medium (M) wurden auf reduzierenden 9% SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Fluorogramme dieser Gele sind abgebildet. Am linken Rand der Gelspuren sind jeweils die Positionen von Molekulargewichtstandards gezeigt. Am Rand der rechten Gelspur sind die Positionen der Schweren Kette (HC) und der Leichten Kette (LC) des IgM durch einen Pfeil angedeutet.

Die sulfatmarkierte Schwere Kette von sekretiertem IgM (HC) wurde auf die Anwesenheit von Tyrosin-(^{35}S)sulfat durch alkalische Hydrolyse und durch enzymatische Hydrolyse (Pronase) analysiert. Die Hydrolysate wurden durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese aufgetrennt (rechte Abbildungen) (1. Dimension (1) = pH 1,9; 2. Dimension (2) = pH 3,5). Autoradiogramme der Cellulosedünnschichtplatten sind gezeigt. Die Position von Tyrosinsulfat wurde nach Ninhydrinfärbung von komigriertem Standard (5 μg) bestimmt. In den Pronasehydrolysaten wurden zusätzlich je 5 μg Threoninsulfat- (Thr(S)) und Serinsulfatstandard (Ser(S)) komigriert und die Positionen durch Ninhydrinfärbung bestimmt (gestrichelte Linien).

gesamten tyrosin-markierten Proteine des Mediums durch SDS-PAGE (Abb.2.2., zweite Spur) stellten die Schweren und die Leichten Ketten des IgM die hauptsekretorischen Proteine dar.

Wenn IgM, das von sulfat-markierten Zellen sekretiert wurde, nach Immunoaffinitätsreinigung auf SDS-Gelen unter reduzierenden Bedingungen analysiert wurde, fand sich radioaktives Sulfat in der Schweren Kette inkorporiert (Abb.2.2., achte Spur). Nach Analyse des immunopräzipitierten IgM unter nicht reduzierenden Bedingungen auf 4% SDS-Gelen migrierte nahezu alle (^{35}S)Sulfatmarkierung in der Position der 19S Form des IgM (nicht abgebildet). In Zellysaten wurde beobachtet, daß nur die 76 kDa Form der Schweren Kette durch Sulfat markiert wurde (Abb.2.2., siebte Spur). In der Leichten Kette war keine Sulfatinkorporation nachweisbar, auch nicht nach längerer Fluorographiedauer. Wenn die gesamten sulfat-markierten Proteine der Zellkulturüberstände durch SDS-PAGE analysiert wurden, erschien die Schwere Kette des IgM als das hauptsulfatierte Protein (Abb.2.2., vierte Spur). Intrazellulär wurden viele sulfatierte Banden beobachtet (Abb.2.2., dritte Spur), wovon die meisten offenbar nicht in das Medium sekretiert wurden.

Die Sulfatierung der Schweren Kette von IgM ist keine singuläre Beobachtung, die auf 81-04 Zellen beschränkt ist. In einer Rattenhybridomazelllinie und in der Myelomazelllinie WEHI 291 wurde ebenfalls Sulfatierung der Schweren Kette von

IgM beobachtet (nicht abgebildet).

2.2. 66% des Sulfates in der Schweren Kette ist an Tyrosinresten gebunden.

Um zu untersuchen, ob Sulfat in der Schweren Kette an Tyrosinreste gebunden war, wurde die immunoaffinitätsgereinigte, sulfat-markierte Schwere Kette von sekretiertem IgM durch SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen getrennt und mit Bariumhydroxid alkalisch hydrolysiert. Die neutralisierten Überstände der Hydrolysate wurden durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese analysiert (Abb.2.2., rechts oben). Hierbei wurde Tyrosinsulfat nachgewiesen. Auf der Suche nach anderen, alkali-labilen sulfatierten Hydroxyaminosäuren wurde die sulfat-markierte Schwere Kette von IgM ausgiebig mit Pronase verdaut und der Überstand nach Acetonpräzipitation durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese analysiert (Abb.2.2., rechts unten). Nur Tyrosinsulfat, aber kein Threonin- oder Serinsulfat konnten nachgewiesen werden.

Um genau zu bestimmen, welches Verhältnis das Tyrosinsulfat an dem gesamten inkorporierten Sulfat in der Schweren Kette des IgM einnahm, wurden Zellen mit (^3H)Tyrosin und (^{35}S)Sulfat doppel-markiert. Nach Immunoaffinitätsreinigung und SDS-PAGE wurde die Radioaktivität in der Schweren Kette von sekretiertem IgM aus dem Gelstück mit Pronase eluiert

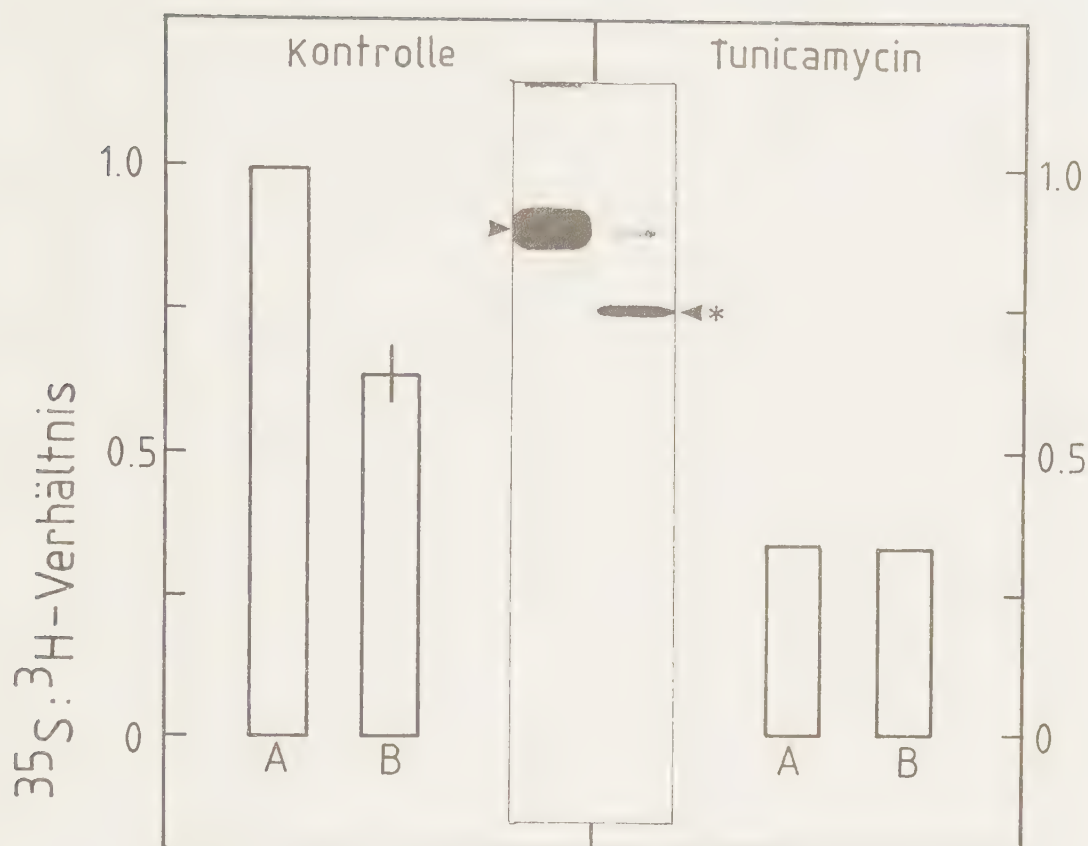


Abb.2.3.: Die Tyrosinsulfatierung der Schwere Kette in der An- oder Abwesenheit von Tunicamycin.

Hybridomazellkulturen wurden in der An- (+) oder Abwesenheit (-) von Tunicamycin mit ^3H Tyrosin und (^{35}S)Sulfat doppelt markiert. Nach Immunopräzipitation, reduzierender SDS-PAGE und Elution aus dem Gel mit Pronase wurde das ^{35}S - zu ^3H -Verhältnis in der Schwere Kette des IgM bestimmt (A). In einem Aliquot des Pronaseeluates wurde nach alkalischer Hydrolyse und anschließender Neutralisierung ebenfalls das ^{35}S - zu ^3H -Verhältnis (in Triplikaten $\pm$ Standardabweichung) bestimmt (B). Das Verhältnis in der Kontrolle vor alkalischer Hydrolyse (A, linke Seite) wurde gleich 1,0 gesetzt. Die Wiederauffindungswerte für (^3H)Tyrosin und Tyrosin(^{35}S)sulfat nach alkalischer Hydrolyse waren gleich (ca 90%). In der Mitte der Abbildung ist ein Fluorogramm eines reduzierenden 10% SDS-Gels gezeigt. Zellkulturen wurden in der Ab- oder Anwesenheit von Tunicamycin mit (^{35}S)Sulfat markiert und IgM aus Aliquots der Zellkulturüberstände immunoaffinitäts gereinigt.

und in einem Aliquot des Eluates das $^{35}\text{S}:$ ^3H -Verhältnis gemessen. Ein zweites Aliquot des Pronaseeluates wurde alkalisch hydrolysiert und anschließend mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert. Hierbei wird alkali-labiles Sulfat, das während der Hydrolyse freigesetzt wird, als Bariumsulfat präzipitiert, während das alkali-stabile Tyrosinsulfat (und Tyrosin) quantitativ im Überstand bleiben (Huttner, 1984). In Abb.2.3., linke Seite, ist gezeigt, daß im Vergleich zum Pronaseeluat (A) das $^{35}\text{S}:$ ^3H -Verhältnis im neutralisierten Überstand (B) um 34% abgenommen hat. Das $^{35}\text{S}:$ ^3H -Verhältnis im Tyrsosinsulfatfleck nach Dünnschichtelektrophorese wich nicht signifikant vom Verhältnis in den neutralisierten Überständen nach alkalischer Hydrolyse (nicht abgebildet) ab, was zeigt, daß im Wesentlichen alles Sulfat, das im Überstand nach Neutralisierung übrig blieb, Tyrosinsulfat war. Die Ergebnisse zeigen, daß 66% des radioaktiven Sulfates in der Schwere Kette des IgM als Tyrosinsulfat vorhanden waren.

Wenn die (^{35}S)Sulfat-markierte Schwere Kette des IgM nach Pulsmarkierung für 5 Minuten bei 37°C oder für 10 Minuten bei 20°C auf das Verhältnis von alkali-stabilem zu alkali-labilem (^{35}S)Sulfat analysiert wurde, ergaben sich gleiche Verhältnisse wie nach Langzeitmarkierung mit Sulfat bei 37°C (siehe oben). Dies zeigt, daß die Schwere Kette nach Pulsmarkierung bei 37°C als auch nach Pulsmarkierung bei 20°C an Tyrosin sulfatiert war.

2.3. 34% des Sulfates in der Schweren Kette kommen in N-gebundenen Oligosacchariden vor.

Da neben Tyrosinsulfat keine anderen sulfatierten Hydroxyaminosäuren nachweisbar waren (Abb.2.2., rechts unten) und da Sulfat in Kohlenhydraten unter den vorliegenden alkalischen Bedingungen hydrolysiert wird, lag nahe, daß die 34% des Sulfates, die nicht als Tyrosinsulfat auffindbar waren, als Kohlenhydratsulfat vorlagen. Da bekannt ist, daß die Schwere Kette des IgM N-glykosyliert ist (siehe Tartakoff et al., 1979), war es sehr wahrscheinlich, daß die 34% alkali-labiles Sulfat in N-gebundenen Oligosacchariden vorkamen. Um diese Vermutung zu bestärken, wurden Zellkulturen in der Anwesenheit von Tunicamycin, einem Inhibitor der N-Glykosylierung (siehe Schwarz und Datema, 1982; Elbein, 1981), mit (^{35}S)Sulfat markiert. Im Vergleich zur Kontrolle (Abb.2.3., zentrale Abbildung, linke Spur) hatte die nicht-glykosylierte Schwere Kette des IgM eine größere Mobilität (apparente Molmasse 61000 Da) und war immer noch sulfatiert (Abb.2.3., zentrale Abbildung, rechte Spur). Nach Doppelmarkierung der Schweren Kette des IgM von 61 kDa mit radioaktivem Sulfat und Tyrosin und anschließender Analyse durch alkalische Hydrolyse war das ^{35}S : ^3H -Verhältnis im Pronaseeluat (A) nahezu identisch mit dem im neutralisierten Überstand (B) (Abb.2.3., linke Hälfte). Das zeigt, daß in der Abwesenheit von Kohlenhydraten alles gebundene Sulfat als alkali-stabiles Tyrosinsulfat vorhanden war. Der Befund, daß Tunicamycin,

ein spezifischer Inhibitor der N-Glykosylierung, diesen Effekt bewirkt hat, unterstützt die Annahme, daß die Schwere Kette des IgM an N-gebundenen Kohlenhydratresten sulfatiert war.

Wenn die in Abb.2.3. mit B bezeichneten Säulen, die die Tyrosinsulfatierung unter Kontroll- und Tunicamycinbedingung wiedergeben, miteinander verglichen werden, fällt auf, daß nach Hemmung der N-Glykosylierung der Schweren Kette des IgM durch Tunicamycin die Tyrosinsulfatierung um einen Faktor von 2 abnahm.

2.4. Die Schwere Kette des IgM ist substöchiometrisch sulfatiert.

Um die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung in der Schweren Kette des IgM zu bestimmen, wurden Zellkulturen mit (^{14}C)Tyrosin markiert. Nach Immunoaffinitätsreinigung und SDS-PAGE wurde die tyrosin-markierte Schwere Kette von sekretiertem IgM alkalisch hydrolysiert und (^{14}C)Tyrosin von (^{14}C)Tyrosinsulfat durch ein zweidimensionales System getrennt (siehe auch Kapitel 5). Nach Autoradiographie der Cellulosedünnschichtplatte (Abb.2.4.) wurden die entsprechenden radioaktiven Flecken ausgeschnitten und die Radioaktivität gemessen. Es wurde berechnet, daß 0,73% der gesamten Tyrosinreste sulfatiert waren (Berechnung siehe Kapitel 5). Beruhend auf der Anzahl von Tyrosinresten, die in dem Maus-IgM des Klonen MOPC 104E (Kehry et al., 1979))

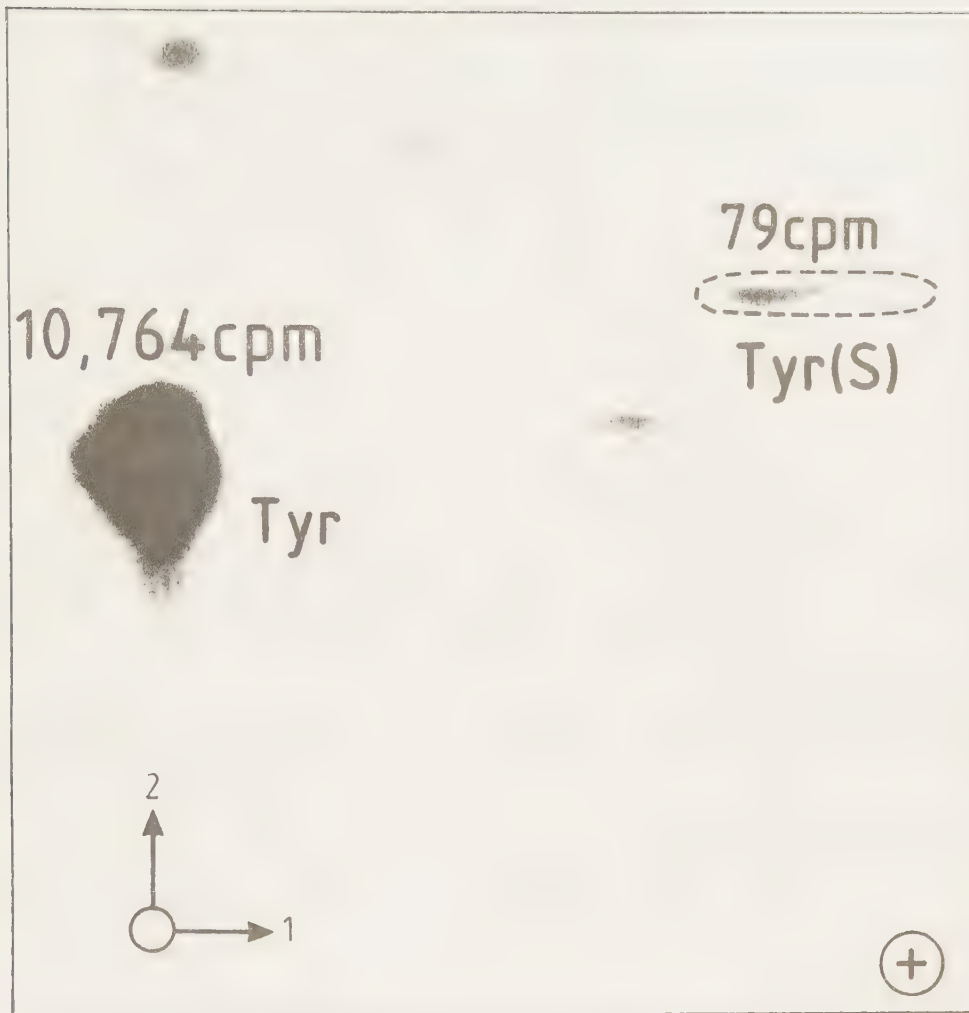


Abb.2.4.: Die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung in der Schwere Kette des IgM. In Zellkultur mit (^{14}C)Tyrosin markierte Schwere Kette des IgM wurde nach Isolierung durch Immunopräzipitation und reduzierende SDS-PAGE alkalisch hydrolysiert und das Hydrolysat zweidimensional durch pH 3,5-Elektrophorese (1) und aufsteigende Chromatographie (2) aufgetrennt. Das Autoradiogramm einer Dünnschichtcelluloseplatte ist gezeigt. Die Positionen von Tyrosinsulfat (Tyr(S)) und Tyrosin (Tyr) wurden nach Ninhydrinfärbung von komigrierten Standards (je 5 μg) bestimmt und sind durchgestrichelte Linien angezeigt. Die Wiederauffindungswerte von (^{14}C)Tyrosin und (^{14}C)Tyrosinsulfat für diese Methode sind nahezu gleich und in Kapitel 4 (Tab.4.2.) angegeben.

durch Aminosäuresequenzierung bestimmt wurde (9 Reste in der Variablen und 13 Reste in der Konstanten Region), kann eine Stöchiometrie von 0,16 Mol Tyrosinsulfat pro Mol Schwerer Kette berechnet werden. Unter der Annahme, daß in der hier untersuchten Schweren Kette kein Tyrosin in der Variablen Region vorkommt, ergäbe sich eine minimale Stöchiometrie von 0,10 Mol Tyrosinsulfat pro Mol Schwerer Kette. Da nahezu alle Schweren Ketten, im Medium wie in Zellen, in der 19S-Form des IgM (10 Schwere Ketten) vorhanden waren, errechnet sich, daß 1 Mol 19S IgM im Durchschnitt 1-2 Mole Tyrosinsulfat besaß.

2.5. Von den intrazellulären Formen der Schweren Kette des IgM sind nur die terminal glykosylierten Formen sulfatiert.

Nach Markierung von Zellkulturen mit (^3H)Tyrosin konnten zwei intrazelluläre Formen der Schweren Kette des IgM mit apparenten Molmassen von 71 und 76 kDa immunopräzipitiert werden (Abb.2.2., fünfte Spur, Abb.2.6., erste Spur). Das Mengenverhältnis der beiden Formen variierte während der Kultivierung der Zellen, wobei die 71 kDa-Form über längere Kulturperioden prominenter wurde.

Um die Beziehung der beiden intrazellulären Formen der Schweren Kette des IgM zueinander zu untersuchen, wurden Zellkulturen mit (^{35}S)Methionin für die in Abb.2.5. angegebenen Zeiten puls-chase-markiert. IgM wurde dann aus einem Lysat der gesamten Zellkultur (Medium plus Zellen)

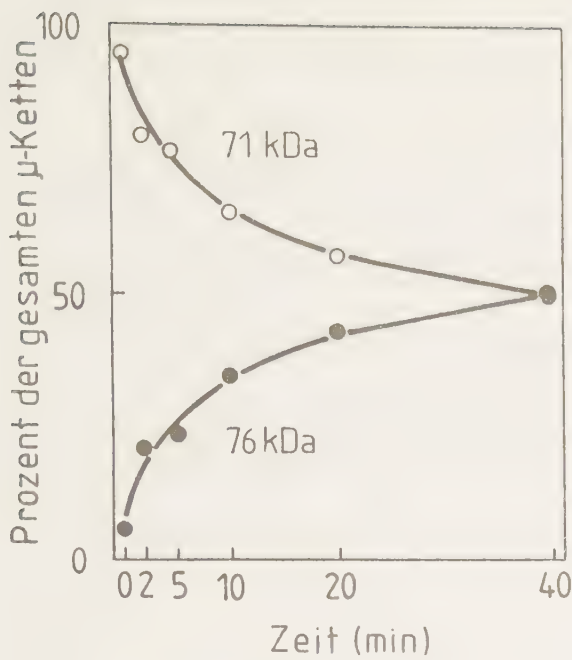


Abb.2.5.: Kinetik der Umwandlung der intrazellulären 71 kDa Form der Schweren Kette in die 76 kDa Form. Hybridomazellkulturen wurden mit [^{35} S]Methionin pulsmarkiert und aus Aliquoten der Zellkultur (Zellen plus Medium) nach verschiedenen Zeiten IgM immunopräzipitiert und auf reduzierenden SDS-Gelen analysiert. Die Radioaktivität in der 71 kDa-Form und die in der 76 kDa-Form wurden für einen jeweiligen Zeitpunkt addiert und der Prozentsatz der jeweiligen Form an der Summe der beiden Formen berechnet und aufgetragen.

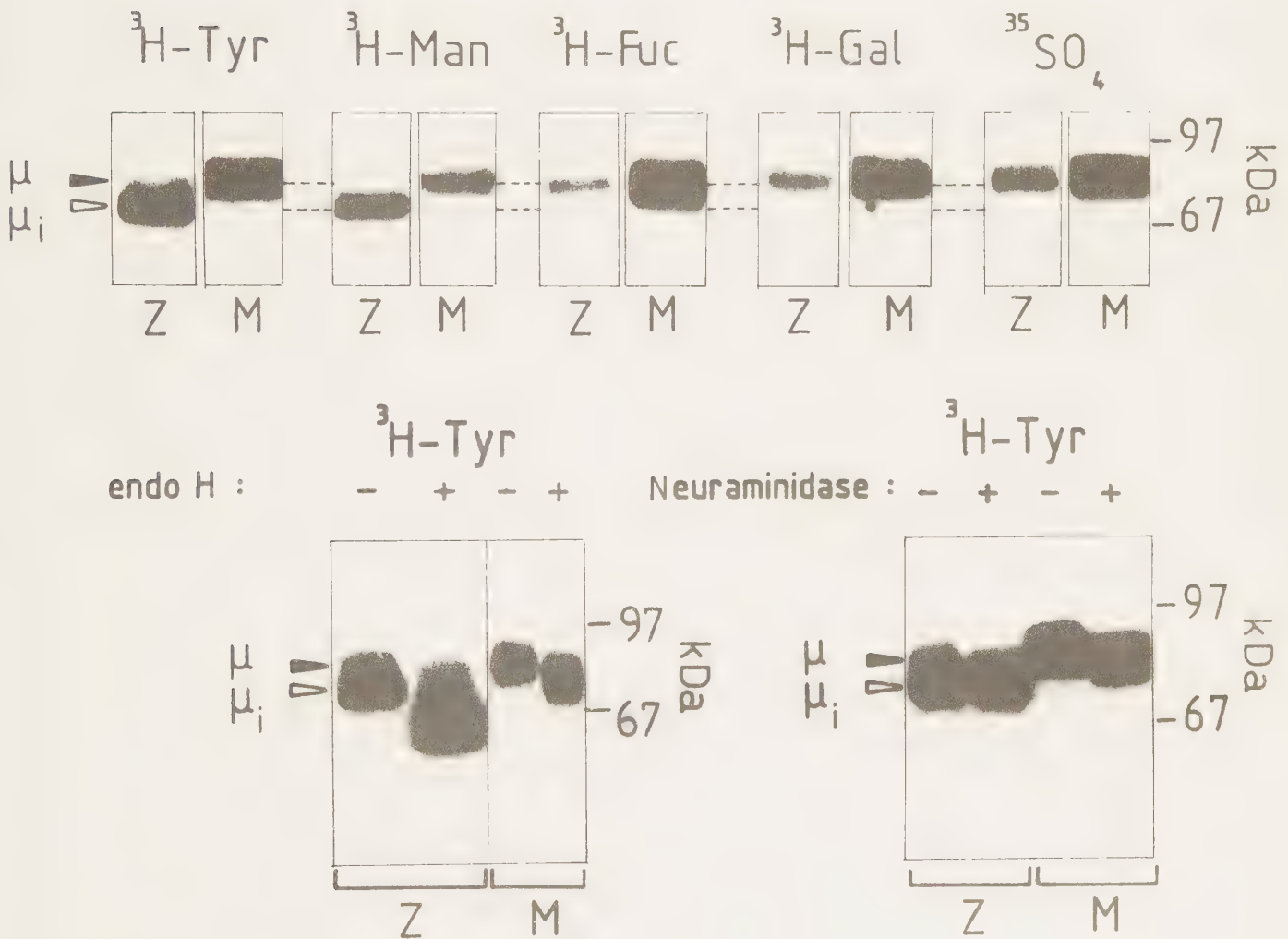


Abb.2.6.: Charakterisierung der N-gebundenen Oligosaccharide und der Sulfatierung in den intrazellulären und sekretierten Formen der Schweren Kette des IgM. Zelluläre Formen der Schweren Kette (Z) sowie Formen im Medium (M) wurden nach Markierung von Hybridomazellen mit [^3H]Tyrosin ($^3\text{H-Tyr}$), [^3H]Mannose ($^3\text{H-Man}$), [^3H]Fukose ($^3\text{H-Fuc}$), [^3H]Galaktose ($^3\text{H-Gal}$) oder [^{35}S]Sulfat immunopräzipitiert und durch SDS-PAGE analysiert. Ausschnitte aus Fluorogrammen von reduzierenden 7,5% SDS-Gelen sind gezeigt. Die Positionen der beiden intrazellulären Formen der Schweren Kette mit 71 und 76 kDa und der sekretierten Formen mit 76 kDa sind durch Pfeile und gestrichelte Linien angedeutet. An den rechten Seiten der Abbildungen sind die Positionen von zwei Molekulargewichtstandards gezeigt. Aliquots des Immunopräzipitats von [^3H]Tyrosin-markiertem IgM wurden in der An- (+) oder Abwesenheit (-) von Endo- β -N-Acetylglukosaminidase H (endo H) oder Neuraminidase inkubiert und die Proben durch reduzierende SDS-PAGE analysiert (untere Abbildungen).

immunopräzipitiert und die Radioaktivität in den beiden Formen der Schwere Ketten nach SDS-PAGE quantifiziert. Wie in Abb.2.5. gezeigt, war zu Beginn der Chase-Periode nur die 71 kDa-Form vorhanden. Zeitabhängig nahm dann die Menge an 76 kDa-Form zu, unter gleichzeitiger Abnahme der 71 kDa-Form. Diese Ergebnisse zeigen, daß die 71 kDa-Form eine Vorläuferform der 76-kDa Form war.

Um zu zeigen, daß die beiden intrazellulären Formen der Schwere Kette des IgM durch unterschiedlich modifizierte N-gebundene Kohlenhydratreste, die wiederum unterschiedliche Lokalisationen des IgM während des intrazellulären Transportes widerspiegeln (siehe Schema), hervorgerufen wurden, wurden sie durch Markierung mit (^3H)Galaktose, (^3H)Fukose und (^3H)Mannose charakterisiert. Um die Anwesenheit von mannosereichen Oligosacchariden und die Anwesenheit von Sialinsäure zu untersuchen, wurde tyrosin-markiertes IgM mit Endo- β -N-acetylglucosaminidase H (Tarentino et al., 1974), bzw. mit Neuraminidase (Spiro, 1962) behandelt.

Wie in Abb.2.6. (oben) gezeigt, inkorporierte die 71 kDa-Form, die im Vergleich zur 76 kDa-Form intrazellulär abundanter war, radioaktive Mannose, sehr wenig Fukose und keine Galaktose. Eine Behandlung mit Endo H veränderte stark die Mobilität der 71 kDa-Form im SDS-Gel zu schneller migrierenden Formen mit 60-67 kDa, was auf das Vorhandensein vieler mannosereicher Oligosaccharidereste in der Schwere Kette hindeutet (Abb.2.6., unten links). Die Mobilität der

71 kDa-Form im SDS-Gel wurde nicht durch eine Behandlung mit Neuraminidase beeinflusst (Abb.2.6., unten rechts), was auf die Abwesenheit signifikanter Mengen von Sialinsäure hindeutet. Zusammengefaßt zeigen diese Ergebnisse, daß die 71 kDa-Form der Schwere Kette in IgM enthalten war, das sich im rER, dem cis Golgi und dem medialen Golgi Kompartiment befand. Dies sind Kompartimente in denen N-glykosylierte Proteine vorwiegend mit mannosereichen Oligosacchariden gefunden werden (siehe Kornfeld und Kornfeld, 1985), die noch keine Galaktose und Sialinsäure tragen. Im medialen Golgi kann Fukose bereits an basale N-Acetylglukosaminreste angeknüpft werden (siehe Kornfeld und Kornfeld, 1985). Da die 71 kDa-Form keine nachweisbaren Mengen an (^{35}S)Sulfat inkorporierte (Abb.2.6., oben), war es unwahrscheinlich, daß Sulfatierung im rER, dem cis oder medialen Golgi Kompartiment vorkam.

Die intrazelluläre 76 kDa-Form der Schwere Kette zeigte Charakteristika, die denen der 76 kDa-Form im Medium sehr ähnlich waren. Sie inkorporierte im Vergleich zur 71 kDa-Form weniger (^3H)Mannose und inkorporierte im Gegensatz zur 71 kDa Form (^3H)Fukose und (^3H)Galaktose (Abb.2.6., oben). Auch die Mobilität der 76 kDa Form im SDS-Gel veränderte sich nach Behandlung mit Endo H zu schneller migrierenden Formen (Abb.2.6., unten links) jedoch nicht so ausgeprägt wie die der 71 kDa-Form. Für ein (menschliches) Myeloma-IgM wurde berichtet, daß offenbar zwei der fünf mannosereichen Oligosaccharide im

mannosereichen Zustand verbleiben und nicht terminal glykosyliert werden (Putnam et al., 1973). In der hier studierten Zelllinie könnte dieselbe Situation vorgelegen haben. Neuraminidasebehandlung der 76 kDa-Form erhöhte deutlich die Mobilität der Schweren Kette im SDS-Gel (Abb.2.6., unten links), was auf die Anwesenheit signifikanter Mengen Sialinsäure hindeutet (vergleiche auch Abb.2.15.). Im Gegensatz zur 71 kDa-Form inkorporierte die intrazelluläre 76 kDa-Form des IgM (^{35}S)Sulfat (Abb.2.6., oben).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, daß die Sulfatierung der Schweren Kette des IgM in einem Kompartiment stattfand, das im vektoriellen Transport des IgM nach dem medialen Golgi Kompartiment vorkommt.

2.6. Die Sulfatierung und die Sekretion von IgM werden durch Monensin gehemmt.

In vielen Fällen wurde beobachtet, daß Monensin, ein monovalentes Kationenionophor, den intrazellulären Transport sekretorischer und Plasmamembranproteine zwischen medialem und trans Golgi Kompartiment blockiert (Griffiths et al., 1983; siehe Tartakoff, 1983). Da Monensin ebenfalls den intrazellulären Transport des IgM vom medialen zum trans Golgi Kompartiment blockiert (Tartakoff et al., 1981), wird erwartet, daß nach Monensinbehandlung von Zellkulturen keine Sulfatierung der Schweren Kette mehr auftreten kann, falls

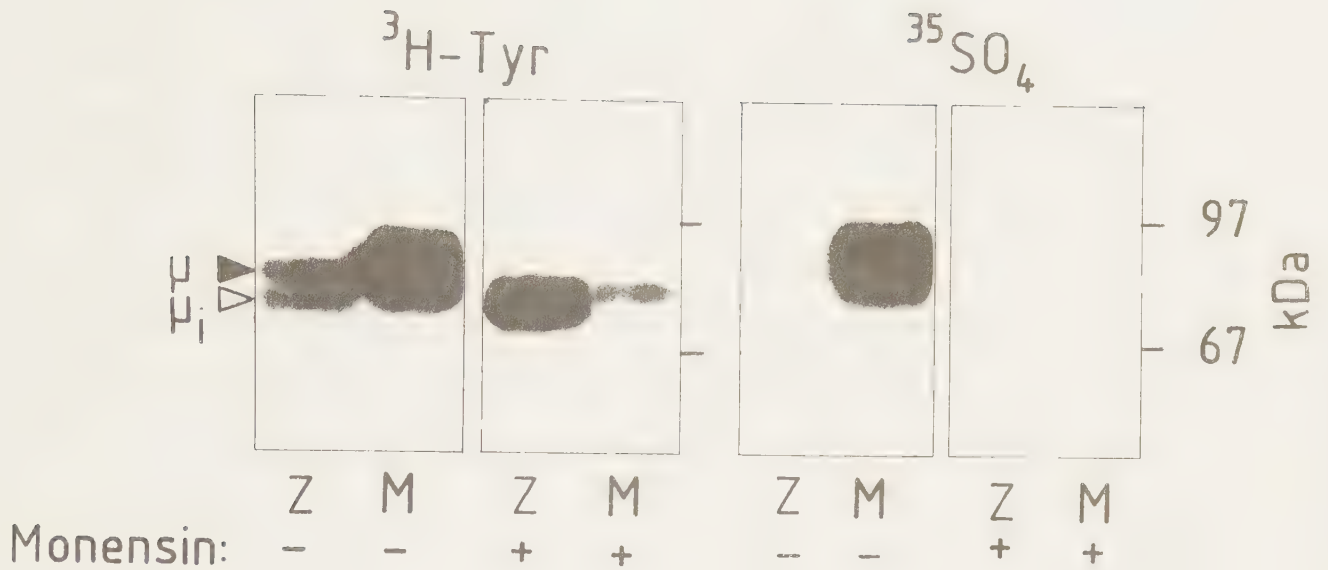


Abb.2.7.: Der Effekt von Monensin auf die Sulfatierung der Schweren Kette des IgM. Hybridomazellkulturen wurden entweder mit [^3H]Tyrosin oder mit [^{35}S]Sulfat in der An- (+) oder Abwesenheit (-) von Monensin markiert und zelluläres (Z) sowie IgM im Medium (M) immunopräzipitiert und auf reduzierenden 7,5% SDS-Gelen analysiert. Ausschnitte aus den Fluorogrammen des Gels sind abgebildet. An der linken Seite der Abbildung sind die Positionen der 71 und der 76 kDa Form der Schweren Kette des IgM und an der rechten Seite die Positionen von zwei Molekulargewichtstandards angezeigt.

die Sulfatierung des IgM nach seinem Transport durch den medialen Golgi stattfindet. Nach Markierung von Zellkulturen mit (^3H)Tyrosin in der Anwesenheit von 10^{-6} M Monensin akkumulierte intrazellulär eine Form der Schweren Kette, die in ihrer Molmasse von 71 kDa der rEr/cis/medium Golgi-Form der Schweren Kette entsprach (Abb.2.7., linke Hälfte). Von dieser Form fand sich nur sehr wenig im Medium. Nach Markierung mit (^{35}S)Sulfat konnte keine Inkorporation in die intrazellulär angehäuften 71 kDa-Form beobachtet werden (Abb.2.7., rechte Hälfte). Wenn gesamte zelluläre und sekretierte Proteine durch SDS-PAGE analysiert wurden, fand sich ein nur sehr geringer Sulfateinbau in zelluläre und nahezu kein Einbau in sekretierte Proteine (nicht abgebildet).

2.7. Mit (^{35}S)Sulfat pulsmarkierte intrazelluläre Schwere Kette des IgM enthält bereits trans Golgi-spezifische Modifikationen.

Um zu untersuchen, ob auch bei sehr kurzen Markierungszeiten Sulfat ausschließlich in die 76 kDa Form inkorporiert wird, und ob die markierten Formen bereits durch trans Golgi-spezifische Enzyme modifiziert waren, wurden Hybridomazellkulturen für 1, 2 und 4 Minuten mit (^{35}S)Sulfat markiert. Um die Inkorporation von Sulfat in Proteine effizient zu stoppen, wurden die gesamten Zellkulturen sofort nach den angegebenen Markierungszeiten in SDS gekocht

und sulfatmarkiertes IgM aus den resultierenden Lysaten immunopräzipitiert. Wie in den Fluorogrammen in Abb.2.8. gezeigt ist, war nach 1 und 2 Minuten noch keine Sulfatmarkierung der Schwere Kette des IgM zu beobachten. Erst bei 4 Minuten Markierungsdauer wurde eine Sulfatinkorporation beobachtet. Die sulfatmarkierte Schwere Kette des IgM wurde auf die Anwesenheit von Sialinsäure durch Neuraminidasebehandlung (Spiro, 1962) und auf die Anwesenheit von Galaktose durch Bindung an Ricinagarose (Baenziger und Fiete, 1979) untersucht. Die Schwere Kette des IgM, das für 4 Minuten mit Sulfat markiert wurde, erlangte nach Neuraminidasebehandlung eine höhere Mobilität in SDS-Gelen (Abb.2.8., links) und wurde an Ricinagarose gebunden (Abb.2.8., rechts).

Wenn der Zeitverlauf der Sulfatinkorporation in die Schwere Kette des IgM verfolgt wurde (Abb.2.9.), war zu beobachten, daß der Sulfateinbau nach Zugabe der Sulfatmarkierung nicht vor 2 Minuten linear anstieg. Diese lag-Phase von zwei Minuten war wahrscheinlich durch die Aufnahme und die Aktivierung des radioaktiven Sulfates, sowie die Translokation des Aktivierten Sulfates (PAPS) in den Golgi Komplex bedingt (siehe Abb.7.1.). Aus der Kinetik in Abb.2.9. ist ersichtlich, daß ungefähr 80% des Sulfates, das in die Schwere Kette des IgM nach 4 Minuten Markierung eingebaut war, tatsächlich erst zwischen der 2. und 4. Minute nach Zugabe der Markierung eingebaut wurde. Demzufolge fand die Markierung für 4 Minuten effektiv nur

Markierungsdauer :

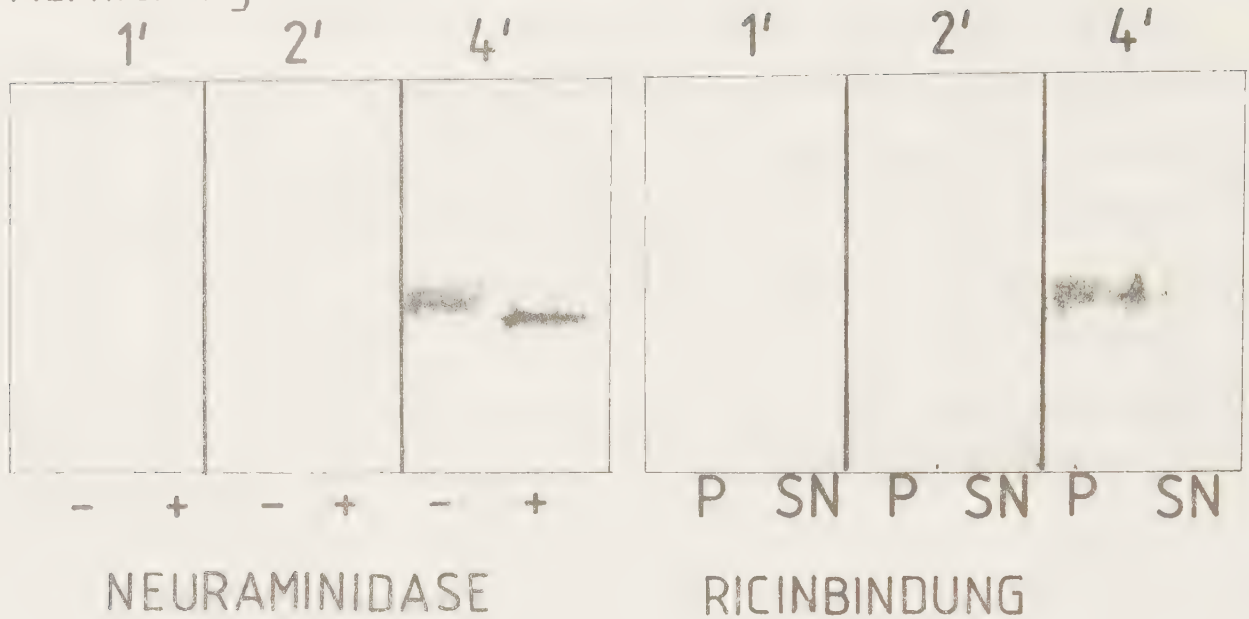


Abb.2.8. : Analyse von sehr kurz in vivo sulfatmarkiertem IgM auf die Präsenz von Sialinsäure und Galaktose.

Hybridomazellkulturen wurden für 1, 2, und 4 Minuten mit [^{35}S]Sulfat markiert. IgM, das aus Lysaten der Zellkulturen (Zellen plus Medium) immunopräzipitiert wurde, wurde auf reduzierenden 7,5% SDS-Gele analysiert. Aliquote des IgM wurden in der An- (+) oder Abwesenheit (-) von Neuraminidase inkubiert und auf Bindung an Ricinagarose getestet (P: Agarosepellet; SN: Überstand nach Ricinbindung). Ausschnitte aus den Fluorogrammen sind gezeigt.

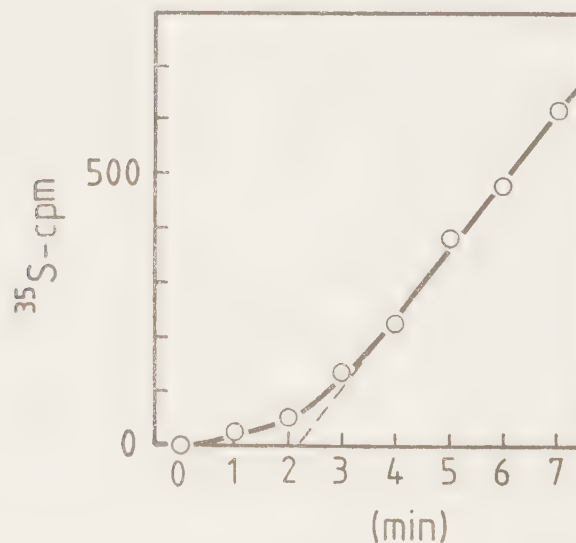


Abb.2.9. : Kinetik der in vivo Inkorporation von [^{35}S]Sulfat in die Schwere Kette des IgM.

Nach Zugabe einer [^{35}S]Sulfatmarkierung wurden einer Hybridomazellkultur Aliquote entnommen und durch 7,5% SDS-Gele analysiert. Aufgetragen ist die ^{35}S -Radioaktivität der Schwere Kette des IgM gegen die Markierungsdauer. Die gestrichelte Linie ist eine Extrapolation des linear verlaufenden Abschnittes der Inkorporation auf die Zeitachse.

für ca 2 Minuten statt. Da die Schwere Kette des IgM, die unter diesen Bedingungen markiert wurde, bereits die trans-Golgi-spezifischen Markierungen Galaktose und Sialinsäure besaß, mußte die Markierung mit Sulfat während oder nach der Modifizierung mit den Zuckern erfolgt sein.

2.8. Die in vitro sulfatierte Schwere Kette des IgM enthält bereits trans Golgi-spezifische Modifikationen.

Um dem Argument zu begegnen, daß der Monensineffekt auf die Sulfatierung nicht nur durch einen spezifischen Transportblock bedingt war, sondern Monensin auch die Sulfatierung im medialen Golgi hemmt, und um dem Argument zu begegnen, daß IgM in vivo im medialen Golgi sulfatiert wird, aber danach sehr schnell in das darauffolgende Kompartiment transportiert wird, in dem dann erst die Addition von Galaktose und Sialinsäure erfolgt, wurden 81-04 Zellen zunächst bei 4°C homogenisiert. Bei dieser Temperatur sind Transportvorgänge außerordentlich verlangsamt (siehe Matlin und Simons, 1983). Vor Erwärmen auf 30°C für die in vitro Sulfatierungsreaktion wurde im Homogenat endogenes ATP durch ein zugegebenes Hexokinase/Glukosesystem (Schlossman et al., 1984) erschöpft. Balch et al. (1984a und b) zeigten, daß ATP für den Transport von Vesikeln zwischen cis und medialem Golgi im zellfreien System notwendig ist. Es wird erwartet, daß für den Vesikeltransport zwischen medialem und trans Golgi ebenfalls ATP benötigt wird. Unter Bedingungen bei

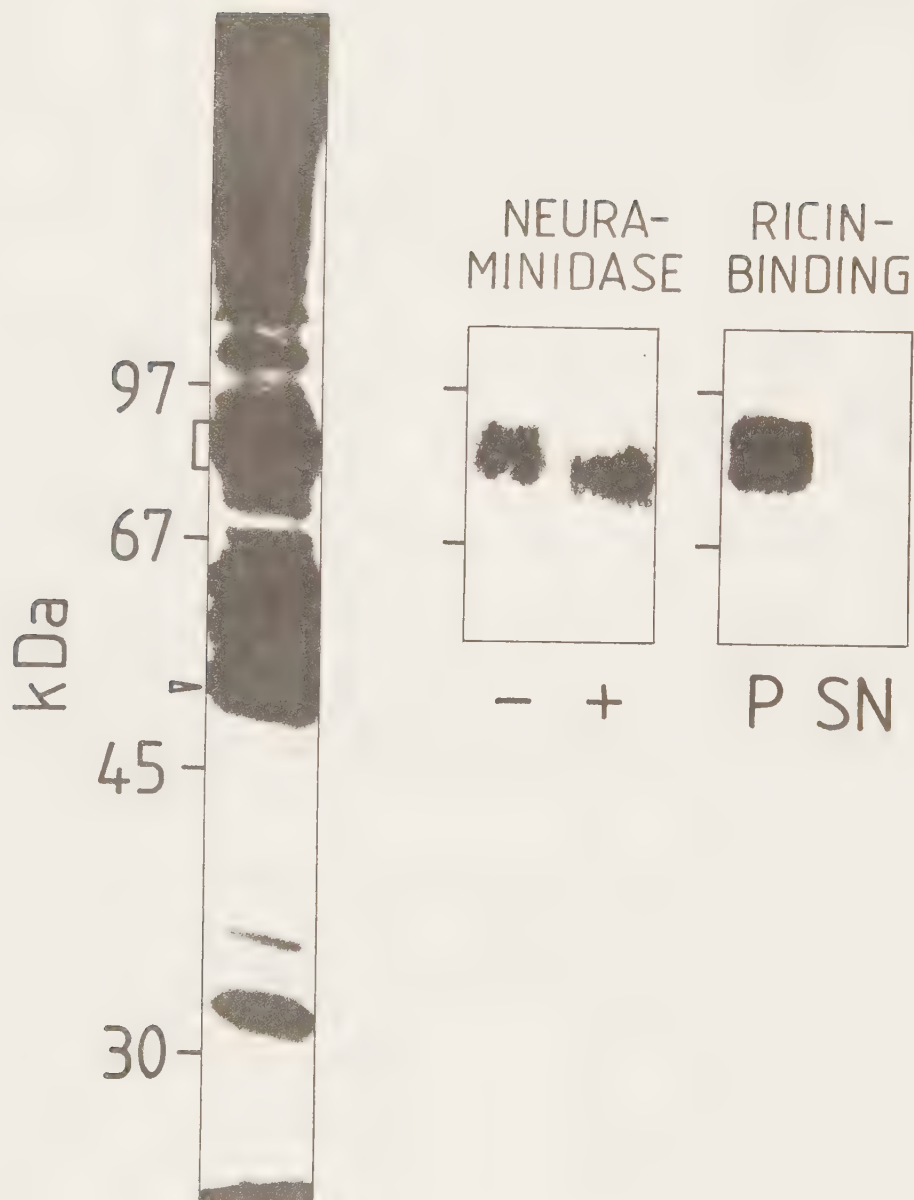


Abb.2.10.: Analyse von in vitro sulfatiertem IgM auf die Anwesenheit von Sialinsäure und Galaktose.

Der 800xg Überstand eines Hybridomazellysates wurde mit $[^{35}\text{S}]$ PAPS inkubiert und ein Aliquot des Reaktionsansatzes durch SDS-PAGE auf einem reduzierenden 7,5% Gel analysiert (erste Spur). Am linken Rand der Gelspur sind die Positionen von Molekulargewichtstandards, die Position der sulfatmarkierten Schweren Kette des IgM (eckige Klammer) und die Position von α -Tubulin (Pfeil) angezeigt. IgM wurde aus dem in vitro-Sulfatierungsansatz immunopräzipitiert und in der An- (+) oder Abwesenheit (-) von Neuraminidase inkubiert sowie auf Bindung an Ricinagarose getestet (P: Agarosepellet; SN: Überstand nach Ricinbindung).

denen kein Vesikeltransport mehr stattfinden kann, kann eine in vitro Sulfatierungsreaktion nur mit dem im Vesikel enthaltenen Enzym und mit kolokalisiertem IgM als Substrat erfolgen, welches dann auf seine Kohlenhydrate hin untersucht werden kann. In den Vesikeln muß außerdem ein Translokator für das Kosubstrat PAPS vorhanden sein.

Der 800xg-Überstand eines Homogenates von 81-04 Zellen wurde für zwei Stunden bei 30°C in der Abwesenheit von ATP mit (³⁵S)PAPS inkubiert. Ein Aliquot des Reaktionsansatzes wurde durch SDS-PAGE analysiert (Abb.2.10., linke Spur). Das Muster sulfatierter Proteine war sehr unterschiedlich von dem, das nach in vitro Sulfatierung in der Anwesenheit eines nicht-ionischen Detergenz beobachtet wurde (nicht abgebildet; Huttner und Baeuerle, 1987). Nicht ionisches Detergenz zerstört die Membranvesikel und erlaubt cytoplasmatischen Proteinen den Zugang zur Tyrosylprotein Sulfotransferase. Ein Hauptsubstrat unter dieser Bedingung ist alpha-Tubulin (Lee und Huttner, 1985). Endogene physiologische Substrate werden in der Regel nach Zugabe von nicht-ionischem Detergenz nicht mehr sulfatiert, da sie sehr stark ausgedünnt werden. Das Sulfatierungsmuster in Abb.2.10 (links) zeigt, daß die Membranvesikel zum großen Teil bei der Homogenisierung intakt geblieben waren, da es dem Sulfatierungsmuster in vivo sehr glich (vgl. Abb.2.2., dritte Spur).

Nach Stoppen der in vitro Sulfatierungsreaktion mit SDS wurde IgM immunopräzipitiert und auf

Neuraminidaseempfindlichkeit sowie Bindung an Ricinagarose getestet. Wie in Abb.2.10. gezeigt, migrierte in vitro sulfatiertes IgM im SDS-Gel mit einer Molmasse von 76 kDa, was der Molmasse von IgM entsprach, das im trans Golgi Kompartiment und im Medium gefunden wurde (siehe 2.5.). In vitro sulfatiertes IgM wurde vollständig an Ricinagarose gebunden und war empfindlich gegenüber einer Neuraminidasebehandlung (Abb.2.10.). Diese Befunde zeigen, daß unter in vitro Bedingungen nur IgM, das trans Golgi-spezifische Modifikationen besitzt, sulfatiert werden kann. Dies spricht dafür, daß Sulfotransferasen und trans Golgi-spezifisch modifiziertes IgM im gleichen Membransystem kolokalisiert waren. Dies ist eine weitere Evidenz dafür, daß Sulfatierung nicht im medialen Golgi stattfindet. Das Membransystem in dem die Sulfatierung in vitro stattfand, mußte über einen Mechanismus zur Translokation von PAPS verfügen, da die Vesikel zum großen Teil intakt waren.

2.9. (^3H)Galaktose- und (^{35}S)Sulfat-pulsmarkiertes IgM werden mit identischen Kinetiken sekretiert.

Die Sulfatierung der Schweren Kette des IgM ist irreversibel.

Nachdem die vorangegangenen Untersuchungen gezeigt haben, daß Sulfatierung von IgM nicht im medialen Golgi Kompartiment, sondern später im intrazellulären Transport des IgM vorkommt, wird nun untersucht, ob Sulfatierung in

dem darauffolgenden Kompartiment, dem trans Golgi, oder später, z.B. in sekretorischen Vesikeln, stattfindet. 81-04-Zellkulturen wurden mit einer Mischung aus (^3H)Galaktose und (^{35}S)Sulfat puls-chase-markiert. Dieses Experiment wurde entworfen, um die Sekretionskinetik der trans Golgi-spezifischen Galaktosemarkierung (Roth und Berger, 1985) in der Schwere Kette des IgM mit der Sekretionskinetik der Sulfatmarkierung in der Schwere Kette zu vergleichen. Es wird erwartet, daß sich eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden Modifizierungsreaktionen in einer signifikant unterschiedlichen Kinetik der Sekretion der beiden Markierungen widerspiegeln würde. Damit die Sekretionskinetiken der beiden Markierungen miteinander verglichen werden können, muß jedoch erfüllt sein, daß (1) beide Modifikationen irreversibel sind oder die gleiche Reversibilität besitzen und (2) der Einbau von Radioaktivität in die Kosubstrate (PAPS und UDP-Galaktose) mit gleichen Kinetiken abläuft.

Nach Pulsmarkierung für 5 Minuten mit einer Mischung aus radioaktiver Galaktose und radioaktivem Sulfat wurden die Zellkulturen nach verschiedenen Chase-Zeiten analysiert. Da nach sehr kurzen Markierungszeiten die Schwere Kette des IgM die hauptsulfatierte und -galaktosylierte Bande war und durch SDS-PAGE gut von anderen markierten Banden abgetrennt werden konnte, wurden Zellen und Medium ohne Affinitätsreinigung von IgM direkt durch SDS-PAGE analysiert. Dies resultierte in einer sehr guten

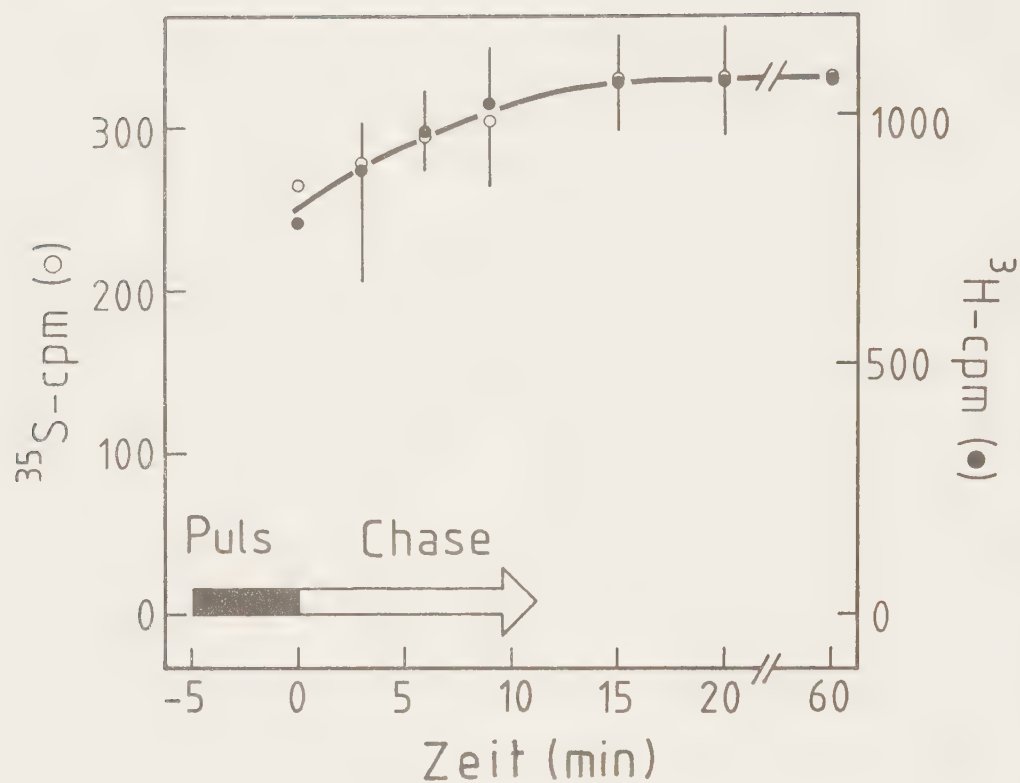


Abb. 2.11.: Kinetik der Inkorporation von radioaktivem Sulfat und Galaktose in die Schwere Kette des IgM nach Pulsmarkierung. Hybridomazellkulturen wurden mit einer Mischung aus [^{35}S]Sulfat und [^3H]Galaktose pulsmarkiert und nach den angegebenen Zeiten in Aliquoten der Zellkultur (Zellen plus Medium) nach reduzierender SDS-PAGE die ^3H - bzw. ^{35}S -Radioaktivität in der Schwere Kette bestimmt.

Wiederauffindungsrate des IgM zur Berechnung der Sekretionskinetiken.

Durch die Aufaddierung der ^3H - bzw. ^{35}S -Radioaktivität in der Schwere Kette des IgM, die zu einem gegebenen Zeitpunkt in Zellen und Medium gefunden wurde (Abb.2.11.), konnte gezeigt werden, daß für beide Markierungen der Einbau der Radioaktivität in die Schwere Kette nach Beginn der Chase-Periode mit denselben Kinetiken weiter anstieg und nach 12 Minuten ein Plateau erreichte (Abb.2.11.). Dies zeigte, daß sowohl die Galaktosemarkierung als auch die Sulfatmarkierung irreversibel an die Schwere Kette gebunden wurden. Da die Kinetiken, mit denen der Einbau von radioaktiver Galaktose und Sulfat in IgM nach dem Chase abnahm, nicht signifikant unterschiedlich waren, kann gefolgert werden, daß die Kosubstrate (PAPS und UDP-Galaktose) mit sehr ähnlichen Kinetiken markiert wurden.

Die Ergebnisse des Puls-Chase-Experiments sind in einer semilogarithmischen Auftragung in Abb.2.12a. dargestellt. Die Prozentzahl an IgM, das zu einem gegebenen Zeitpunkt vom gesamten markierten IgM (in Zellen und Medium) sekretiert worden war, wurde, basierend auf der aktuellen Summe von sekretiertem plus zellulärem IgM zu einem gegebenen Zeitpunkt, berechnet. Kein signifikanter Unterschied in den Sekretionskinetiken von galaktose- und sulfatmarkierter Schwerer Kette des IgM wurde gefunden (Abb.2.12a., linke Geraden). Die gemeinsame Sekretionskinetik unterschied sich jedoch klar von der tyrosinmarkierter Schwerer Kette, deren

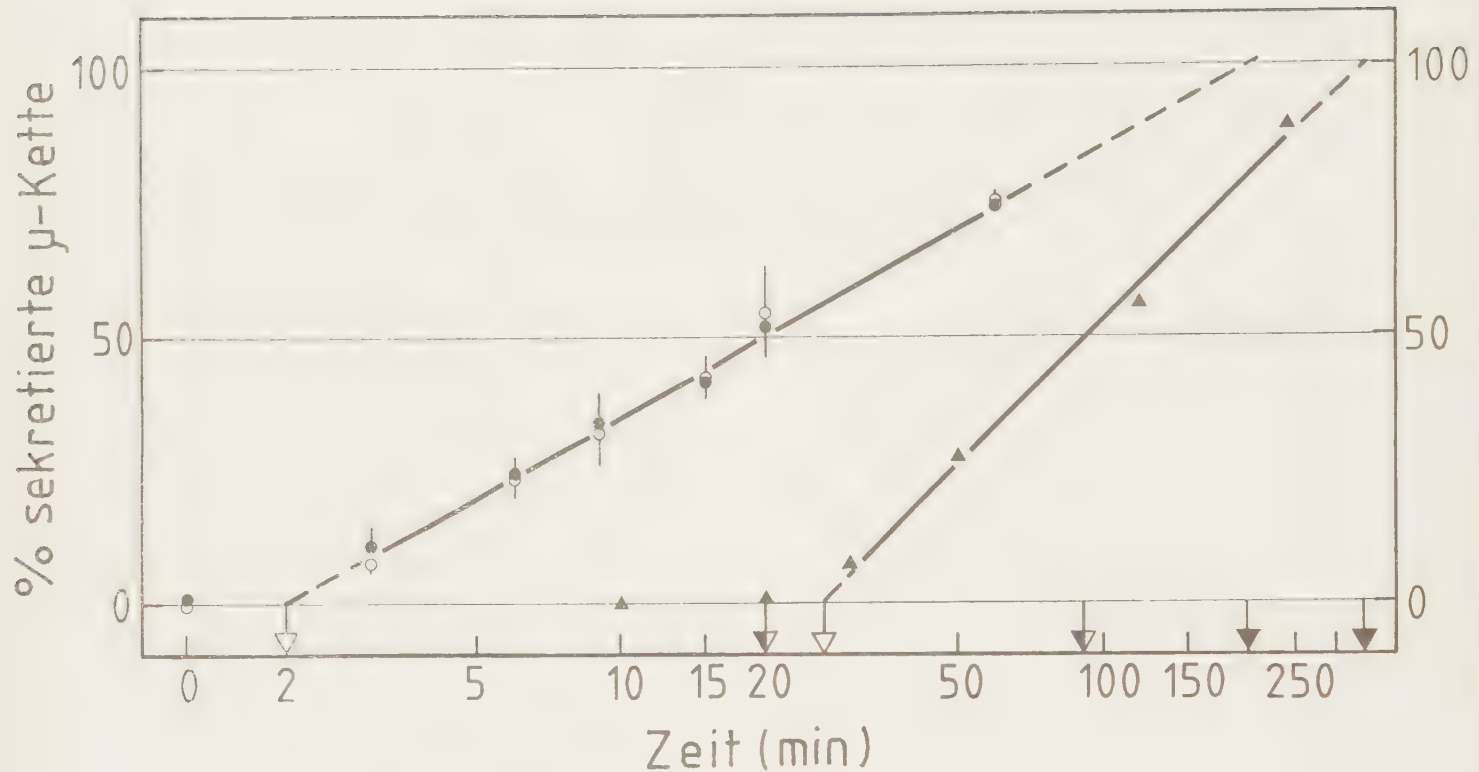


Abb. 2.12a: Zeitverlauf der Sekretion der Schweren Kette des IgM nach Doppelpulsmarkierung mit radioaktiver Galaktose und Sulfat und nach Pulsmarkierung mit Tyrosin. Hybridomazellkulturen wurden mit einer Mischung von [^3H]Galaktose und [^{35}S]Sulfat oder mit [^3H]Tyrosin pulsmarkiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden Aliquote der Zellkultur durch reduzierende SDS-PAGE analysiert und die Radioaktivität in der Schweren Kette des IgM von Zellen und Medium bestimmt. Aufgetragen ist der Prozentsatz der intrazellulären Schweren Kette des IgM an der Summe von sekretierter plus intrazellulärer Schwerer Kette gegen eine logarithmische Zeitskala. Die Werte für den Galaktosepuls (ausgefüllte Kreise) und für den Sulfatpuls (nicht ausgefüllte Kreise) wurden in Triplikaten bestimmt. Die Standardabweichungen sind als Balken eingetragen. Die Werte für den Tyrosinpuls (Dreiecke) wurden in einer anderen Serie von Experimenten mit einem unterschiedlichen Protokoll gewonnen (siehe Materialien und Methoden 3.3.). Die gestrichelten Linien stellen Extrapolationen des linearisierten Sekretionsverlaufs dar. Die Schnittpunkte der Geraden mit den 0-, 50- und 100%-Linien sind auf der Zeitachse mit Pfeilen markiert und in Tab. 2.1. aufgeführt.

Sekretion weitaus länger dauerte (Abb.2.12a., rechte Gerade). Diese Ergebnisse deuten sehr stark darauf hin, daß die Sulfotransferase(n) und die Galaktosyltransferase(n) zusammen im trans Golgi Kompartiment lokalisiert sind.

Die semilogarithmische Auftragung, die hier verwendet wurde, ergab Geraden sowohl für die Sekretionskinetiken der sulfatmarkierten ($r=0,9976$) und der galaktosemarkierten ($r=0,9966$), als auch für die tyrosinmarkierten ($r=0,9968$) Schweren Ketten des IgM. Wenn die Geraden so extrapoliert wurden, daß sie den Nullprozentwert auf der Ordinate schnitten (Abb.2.12a), konnte ein Zeitpunkt nach der Pulsmarkierung abgelesen werden, an dem die ersten markierten IgM-Moleküle die Zelle verließen (bezeichnet als t_0). Der Schnittpunkt der Geraden mit dem Hundertprozentwert spiegelte den Zeitpunkt wider, bei dem die Sekretion des markierten IgM abgeschlossen sein sollte (bezeichnet als t_{100}). Der Zeitpunkt nachdem 50% des markierten IgM sekretiert war, ist als t_{50} bezeichnet. Die erhaltenen t_0 -, t_{50} - und t_{100} -Werte sind in Tab.2.1. aufgeführt. Wie die t_0 -Zahlen zeigen, war die minimale Zeit, die ein IgM-Molekül benötigte, das im trans Golgi Apparat mit Galaktose oder Sulfat markiert wurde, um in das Medium zu gelangen, 2 Minuten. Für ein IgM-Molekül, in das im rER radioaktives Tyrosin eingebaut wurde, betrug die minimale Zeit in das Medium zu gelangen 25 Minuten (Tab.2.1.).

Die beobachteten Kinetiken der Sekretion von pulsmarkiertem

(1) Die Translokations-"reaktion" :



(2) Aus der Sekretionskinetik in Abb.2.9a. abgeleitete Gleichung :

$$[\text{IgM}^*_{\text{Medium}}] = [\text{IgM}^*_{\text{gesamt}}] \cdot (a \log t - a \log t_0)$$

IgM^* = pulsmarkiertes Immunoglobulin M

$[\]$ = Menge (cpm)

a = Sekretionskonstante $a (= \frac{1}{2}(\log t_{50} - \log t_0)^{-1})$

t_{50} = Zeit nach der 50% des markierten IgM sekretiert wurde

t_0 = Zeit nach der erstes pulsmarkiertes IgM im Medium erscheint

t = Zeit nach Puls

Abb.2.12b: Mathematische Beschreibung der Sekretionskinetiken von pulsmarkiertem IgM aus Hybridomazellen (siehe Abb. 2.12a.). Erläuterungen siehe Text.

	min	Sekretionskonstante a min^{-1}
(^3H) Galaktose-/ (^{35}S) Sulfatpuls	$t_0 = 2$	
	$t_{50} = 20$	0,50
	$t_{100} = 200$	
(^3H) Tyrosin	$t_0 = 26$	
	$t_{50} = 94$	0,89
	$t_{100} = 330$	

Tab.2.1.: Zeit- und Sekretionskonstanten für pulsmarkiertes IgM. t_{100} = Zeit nach der alles pulsmarkierte IgM sekretiert wurde. Die Sekretionskonstanten wurden berechnet aus $a = 1/2 (\log t_{50} - \log t_0)^{-1}$

IgM folgten dem Zeitverlauf einer Reaktion Erster Ordnung und ließen sich mathematisch, wie in Abb.2.12b. gezeigt, beschreiben.

2.10. Die Sekretion von (^{35}S)Sulfat-markierter Schwerer Kette des IgM wird bei 20°C verhindert.

Untersuchungen von Matlin und Simons (1983) und Saraste und Kuismanen (1984) zeigten, daß der intrazelluläre Transport viraler Membranglykoproteine in einer reversiblen Weise bei 20°C auf dem Niveau des trans Golgi Komplexes blockiert wird. Dies führt zu einem Anstau terminal glykosylierter viraler Glykoproteine in einer Struktur, die als trans Golgi Netzwerk bezeichnet wird. Wenn sich IgM, ein lösliches sekretorisches Protein, wie die membranintegrierten viralen Glykoproteine verhält, wird erwartet, daß IgM bei 20°C im trans Golgi Netzwerk zwar noch sulfatiert aber nicht mehr weitertransportiert wird. Um dies zu untersuchen, wurden Zellen bei 20°C mit Sulfat pulsmarkiert, dann Aliquote während der Chase-Periode entweder bei 20°C oder bei 37°C weiter inkubiert und anschließend Zellen und Medium separat durch SDS-PAGE analysiert. Im Vergleich zur Pulsmarkierung bei 37°C (Abb.2.13., erste Spur) war der Einbau von radioaktivem Sulfat bei 20°C um den Faktor 8,8 reduziert und ergab ein leicht verändertes Muster sulfatierter Proteine (Abb.2.13., zweite Spur). Die Fluorogramme in Abb.2.13. (zweite und vierte Spur) zeigen den Effekt reduzierter

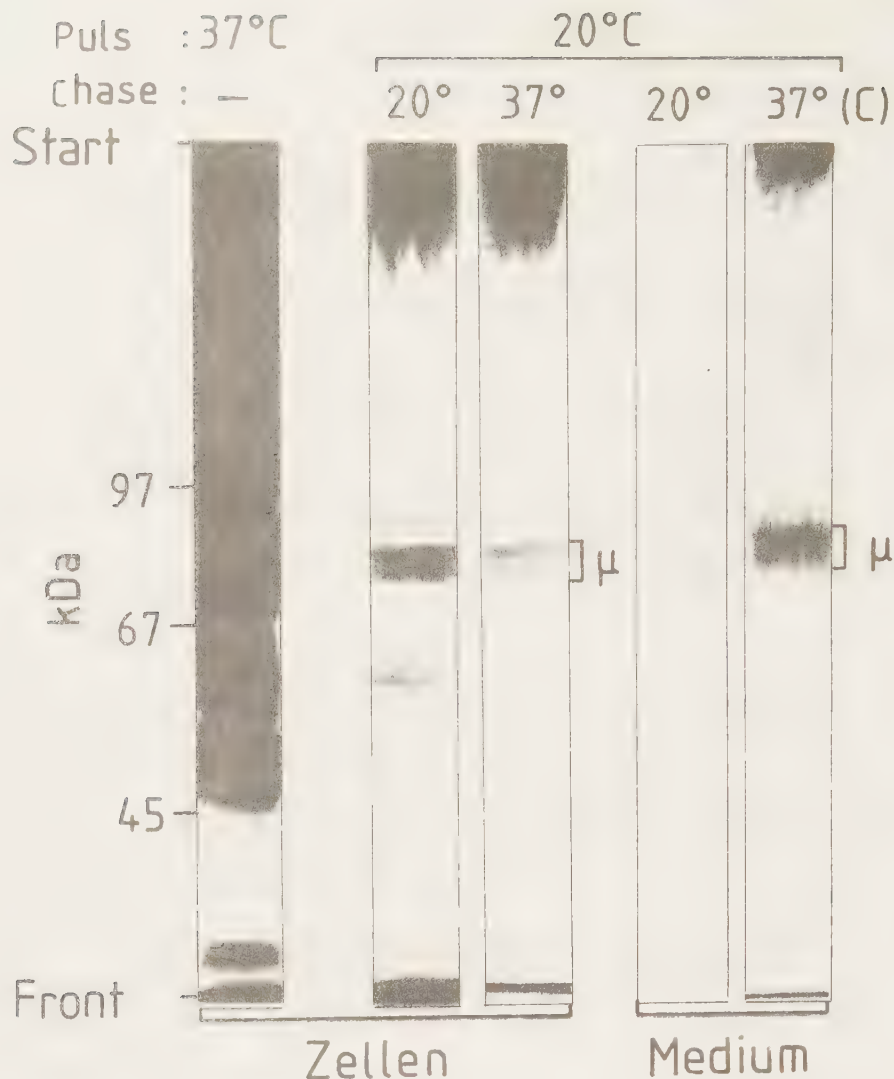


Abb.2.13.: Untersuchung der Sulfatierung und des Transportes von IgM bei 20°C. Hybridomazellkulturen wurden bei 37°C oder 20°C mit Sulfat pulsmarkiert und in Aliquoten der Zellkultur nach verschiedenen Zeiten Zellen und Medium durch reduzierende 7,5% SDS-Gele analysiert. Gezeigt sind Fluorogramme. 1. Spur: Zellen nach Pulsmarkierung bei 37°C; 2.-5. Spur: Zellen und Medien nach Pulsmarkierung bei 20°C. Nur die Gelspuren für 15 Minuten Chasedauer sind gezeigt. An der linken Seite sind die Positionen von Molekulargewichtstandards angezeigt. Die eckigen Klammern geben die Position der Schweren Kette des IgM (μ) wieder.

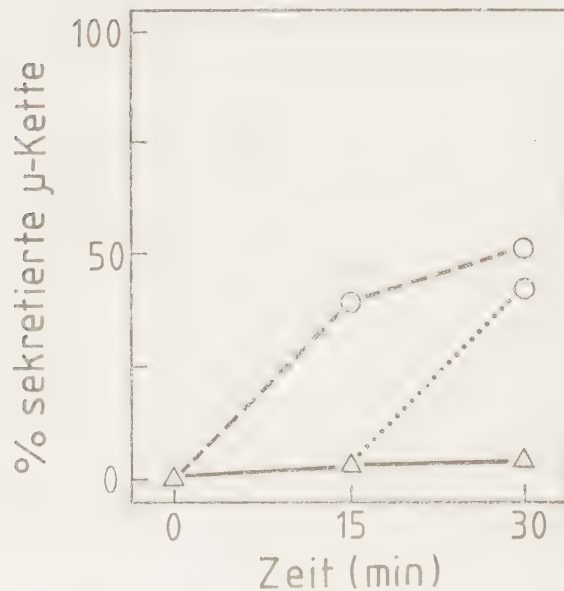


Abb.2.14.: Kinetik der Sekretion von mit Sulfat pulsmarkiertem IgM bei 37°C, 20°C und nach Temperaturverschiebung von 20°C auf 37°C.

Aufgetragen ist der Prozentsatz von sekretierter Schwerer Kette des IgM an der Gesamtmenge der Schweren Kette des IgM in Medium und Zellen gegen die Zeit. Die Schwere Kette des IgM wurde durch Bestimmung der ^{35}S -Radioaktivität quantifiziert, die sich in der Position der Schweren Kette nach reduzierender SDS-PAGE befand (siehe Abb.2.13.). Kreise, gestrichelte Linie: Sekretion bei 37°C; Dreiecke, durchgezogene Linie: Sekretion bei 20°C; gepunktete Linie: Sekretion nach Verschiebung der Temperatur von 20°C auf 37°C.

Temperatur auf die Sekretion sulfatmarkierter Schwerer Kette von IgM nach einer Chase-Periode von 15 Minuten. Im Vergleich zu einem Chase bei 37°C (Abb.2.13., dritte und fünfte Spur), wo nach 15 Minuten etwa 40% des markierten IgM sekretiert war, war keine Sekretion bei 20°C zu beobachten. Wie in Abb.2.14. (punktierte Linie) nach Quantifizierung der Effekte gezeigt ist, wurde das intrazellulär zurückgehaltene IgM nach Erhöhung der Temperatur auf 37°C wieder mit derselben Kinetik sekretiert.

Diese Resultate zeigen, daß der Transport von IgM in Hybridomazellen durch Reduzierung der Temperatur auf 20°C in einer reversiblen Weise verhindert werden kann. Da für Membranglykoproteine gezeigt ist, daß ihr intrazellulärer Transport bei 20°C auf dem Niveau des trans Golgi Netzwerkes blockiert wird (siehe Griffiths und Simons, 1986), ist es möglich, daß der Sekretionsblock für IgM bei 20°C ebenfalls auf Ebene des trans Golgi Netzwerkes lokalisiert ist. Die Sulfatierung von IgM und der inhibierte Transport von IgM bei 20°C sowie die Sekretionskinetik von IgM nach Aufhebung des Blocks stehen im Einklang mit einer Lokalisation der Sulfotransferasen im trans Golgi Netzwerk.

2.11. Sialinsäure in der Schweren Kette des IgM beeinflusst den Grad der Sulfatierung der Schweren Kette.

Gereinigtes (³H)Tyrosin- und (³⁵S)Sulfat-markiertes IgM aus Zellkulturüberständen wurde durch zweidimensionale PAGE

analysiert. Dabei wurde beobachtet, daß der Einbau von (^3H)Tyrosin in die verschiedenen isoelektrischen Varianten nicht parallel mit dem Einbau von (^{35}S)Sulfat (Abb.2.15., oben) verlief. Wenn das Verhältnis der ^{35}S - zu ^3H -Radioaktivität in Varianten von gleichem isoelektrischen Punkt bestimmt wurde, ergab sich, daß die azideren Isoformen mehr Sulfat enthielten als die basischeren. Unsulfatierte Varianten waren nur in Spuren vorhanden. Diese Beobachtungen könnten dadurch erklärt werden, daß die vielen Isoformen in der Schwere Kette des IgM teils ihre unterschiedliche Ladung durch eine verschiedene Anzahl negativ geladener Sulfatgruppen erhielten. Dies ist jedoch in Widerspruch mit dem Befund, daß die Schwere Kette insgesamt im Durchschnitt substöchiometrisch sulfatiert vorlag (siehe Abb.2.4.). In einem Versuch diesen Widerspruch aufzuklären, wurden tyrosin- und sulfatmarkiertes IgM mit Neuraminidase behandelt, um Sialinsäure zu entfernen, die ebenfalls isoelektrische Varianten verursachen kann. Nach dieser Behandlung waren nahezu alle Varianten, die man in der Kontrolle beobachten konnte, verschwunden (Abb.2.15., unten). Die radioaktiven Markierungen erschienen in mehreren basischen Varianten wieder, die vielleicht durch unvollständige Abspaltung von Sialinsäure oder durch Sulfatierung hervorgerufen wurden. Die basischste Variante war unsulfatiert.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die meisten der isoelektrischen Varianten in der Schwere Kette des IgM durch eine

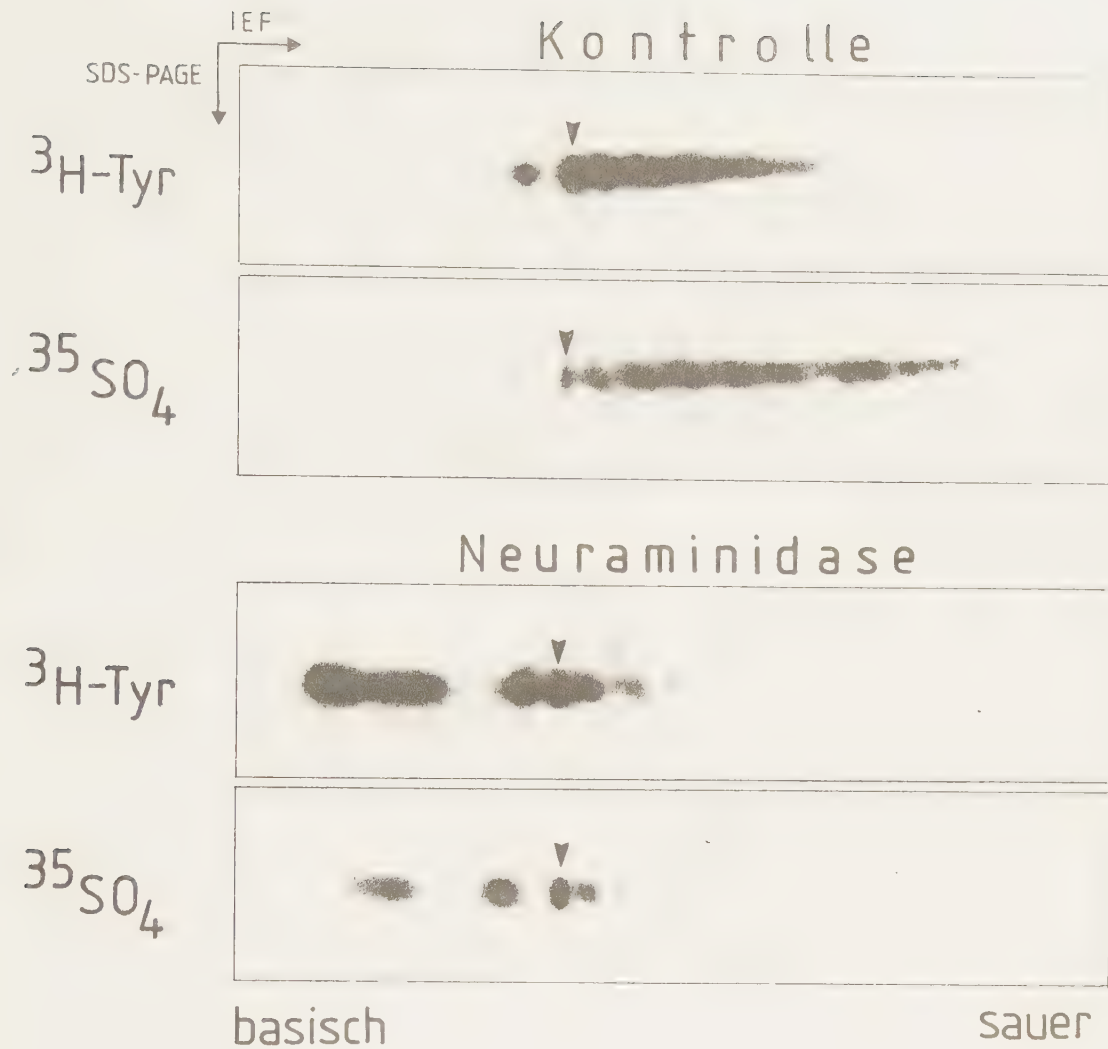


Abb.2.15.: Analyse der Sulfatierung isoelektrischer Varianten der Schweren Kette des IgM durch zweidimensionale Gelelektrophorese. [^3H]Tyrosin- oder [^{35}S]Sulfatmarkiertes IgM, das aus den Überständen von Hybridomazellkulturen immunopräzipitiert wurde, wurde in der An- oder Abwesenheit von Neuraminidase inkubiert und anschließend in der ersten Dimension unter reduzierenden Bedingungen isoelektrofokussiert (IEF) und in der zweiten Dimension auf SDS-Gelen getrennt. Ausschnitte aus Fluorogrammen sind gezeigt. Pfeile geben die Positionen von isoelektrischen Varianten mit gleichem isoelektrischen Punkt an.

verschiedene Anzahl von Sialinsäureresten verursacht wurden. Eine mögliche Erklärung für die Beobachtung, daß in die höher geladenen, azideren Varianten des IgM, die also mehr Moleküle Sialinsäure enthielten nichtsdestoweniger mehr radioaktives Sulfat inkorporiert wurde, ist, daß der Grad der Sulfatierung einzelner isoelektrischer Varianten der Schweren Kette des IgM von deren Gehalt an Sialinsäure abhängig war. Eine solche Abhängigkeit würde bedeuten, daß Sulfatierung nach der Sialylierung im trans Golgi Netzwerk stattfindet.

DISKUSSION

2.1. Die Tyrosinsulfatierung der Schwere Kette des IgM

Mit der Tyrosinsulfatierung der Schwere Kette eines Hybridoma-IgM wurde ein weiteres Proteinsubstrat der Tyrosylproteinsulfotransferase identifiziert, das zur topologischen Klasse der sekretorischen Proteine gehört (vergleiche Tab.E2). Die Sulfatierung der Schwere Kette des IgM ist nicht nur auf die untersuchte Zelllinie beschränkt, sondern wurde ebenfalls in einer Rattenhybridomazelllinie sowie in einer Mäusemyelomazelllinie beobachtet (nicht abgebildet). Daher ist es wahrscheinlich, daß IgM im konstanten Teil der Schwere Kette sulfatiert wird. Der Tyrosinrest 210 im konstanten Teil (Kehry et al., 1979) erfüllt die in Kapitel 3 vorgeschlagene Konsensusstruktur am besten.

Die Schwere Kette des IgM war substöchiometrisch sulfatiert. Von den zehn Schwere Ketten eines IgM-Moleküls wurden nur 1-2 sulfatiert gefunden. Die wahrscheinlichste Erklärung für die substöchiometrische Tyrosinsulfatierung ist, daß die Sulfotransferase eine nur geringe Affinität für die Tyrosinsulfatierungsstelle in der Schwere Kette des IgM besaß. Wie in Kapitel 3 eingehend diskutiert wird, sind Tyrosinsulfatierungsstellen durch die An- oder Abwesenheit bestimmter Aminosäuren gekennzeichnet. Eine Verletzung der in Kapitel 5 ausgearbeiteten Regeln (z.B. die Nähe von

Disulfidbrücken oder N-Glykosylierungsstellen) könnte zur substöchiometrischen Sulfatierung eines Tyrosinrestes führen, der ansonsten in einer passenden Umgebung lokalisiert ist. Gegen eine Unzugänglichkeit der Tyrosinsulfatierungsstelle durch die Anwesenheit von Oligosacchariden spricht die reduzierte Tyrosinsulfatierung nach Hemmung der N-Glykosylierung. Die Nähe einer Disulfidbrücke in Position 213 (Kehry et al., 1979) könnte für eine reduzierte sterische Zugänglichkeit des Tyrosin 210 verantwortlich sein. In keiner der bisher identifizierten Tyrosinsulfatierungsstellen bei denen die Tyrosinreste stöchiometrisch sulfatiert werden, wurde bisher ein Cysteinrest in den Positionen -7 bis +7 um das Tyrosin gefunden (siehe Kapitel 3). Der Befund, daß die Galaktosylierung und die Sialylierung, die im gleichen Kompartiment ablaufen, mit hoher Stöchiometrie die Schwere Ketten modifizieren, lässt auch denkbar erscheinen, daß die Sulfotransferase entweder eine besondere Subkompartimentierung im trans Golgi Netzwerk hat oder besondere sterische Eigenschaften besitzt. Als Folge kommt nur eine Subpopulation des Substrates (innerhalb des 19S IgM-Moleküls) mit den Sulfotransferasen in Berührung.

Substöchiometrische Tyrosinsulfatierung sekretorischer Proteine, wie sie z.B. auch im Faktor X (Morita und Jackson, 1986), im Fibronectin der Ratte (Paul und Hynes, 1984) oder in den Gastrinen (siehe Andersen, 1984) gefunden wird, erzeugt eine Heterogenität im Phänotyp sekretorischer

Proteine. Sulfatierte und unsulfatierte Subpopulationen von Proteinen könnten verschiedene Grade biologischer Aktivität besitzen oder gar eine unterschiedliche biologische Funktion. Die Wechselwirkung mit Komplement könnte z.B. für sulfatierte Schwere Ketten im IgM moduliert sein.

2.2. Die Sulfatierung an Kohlehydratresten der Schweren Kette des IgM

Die Schwere Kette des IgM war zusätzlich in alkali-labiler Form sulfatiert. Mit großer Wahrscheinlichkeit war das alkali-labile Sulfat an Kohlenhydratreste gebunden, da es nach Hemmung der N-Glykosylierung nicht mehr nachweisbar war. Ob es von Bedeutung ist, daß viele tyrosinsulfatierte Proteine (siehe Tab. E2), die gleichzeitig O- oder N-glykosyliert sind, ebenfalls an Kohlenhydratresten sulfatiert werden, ist unklar.

Bei allen Experimenten, die durchgeführt wurden, um die subzelluläre Lokalisierung der Tyrosinsulfatierung aufzuklären, verhielt sich die Sulfatmarkierung in der Schweren Kette des IgM stets einheitlich. Eine unterschiedliche subzelluläre Lokalisation der beiden Formen der Proteinsulfatierung hätte in einigen Versuchen (Monensin, Puls-Chase, Kurzeitmarkierung und 20°C-Block) zu einer Dissoziation der Sulfatmarkierungen führen müssen. Daß dies nicht beobachtet wurde, zeigt, daß Tyrosinsulfatierung und Kohlenhydratsulfatierung im gleichen

subzellulären Kompartiment vorkommen. In dem gleichen Kompartiment sollte ein Protein lokalisiert sein, das PAPS, das Kosubstrat der Sulfatierung, vom Cytosol in das Lumen des Kompartiments transloziert (siehe Perez und Hirschberg, 1986).

2.3. Die subzelluläre Lokalisierung der Sulfatierung der Schweren Kette des IgM

Aus der Summe der folgenden Beobachtungen kann geschlossen werden, daß die Tyrosinsulfatierung als auch die Kohlenhydratsulfatierung der Schweren Kette des IgM ausschließlich im trans Golgi Kompartiment stattfinden:

1) Die Form von IgM, die im rER, cis Golgi und im medialen Golgi Kompartiment vorkommt (nicht terminal glykosyliert, Oligosaccharide vom mannosereichen Typus), wird in vivo nicht mit Sulfat markiert. Nur IgM, das bereits Modifizierungen erhalten hat, die im trans Golgi Kompartiment vorkommen, wird in vivo mit Sulfat markiert. Monensin, das den Weitertransport von IgM vom medialen zum trans Golgi blockiert, führt zur intrazellulären Akkumulation von unsulfatiertem IgM.

2) IgM, das in vivo sehr kurz mit Sulfat markiert wurde, besaß bereits trans Golgi-spezifische Modifikationen.

3) In vitro, unter Bedingungen die keinen Vesikeltransport mehr erlauben, kann nur IgM sulfatiert werden, das bereits trans Golgi-spezifische Modifikationen besitzt.

4) IgM, das im trans Golgi Kompartiment mit Galaktose puls-markiert wird, zeigt die gleiche Sekretionskinetik wie IgM, das mit Sulfat puls-markiert wird.

5) Die Inhibierung des Transportes aber nicht der Sulfatierung von IgM bei 20°C, sowie die Zeitabhängigkeit der Sekretion nach Aufhebung des 20°C-Blocks, sprechen für eine Lokalisierung der Sulfatierungsreaktionen im trans Golgi Netzwerk.

6) Die Beobachtung, daß der Einbau von Sulfat in IgM vom Grad der Sialylierung des IgM abhängig war, deutet darauf hin, daß die Sulfatierung gleichzeitig oder nach der Sialylierung im trans Golgi Kompartiment auftritt.

Die hier durchgeführte subzelluläre Lokalisierung der Sulfotransferaseaktivitäten unterscheidet sich von der etablierten Methode der subzellulären Lokalisation mittels EM-immunocytochemischer Methoden. Bei diesen Methoden werden Antikörper, die gegen das Enzym gerichtet sind, verwendet (siehe z.B. Roth und Berger, 1985), um Enzymmoleküle in Ultradünnschnitten von Zellen immunologisch nachzuweisen. Dabei werden die Positionen von Enzymmolekülen sichtbar gemacht, unabhängig davon ob sie an der lokalisierten Stelle biologisch aktiv sind oder nicht. Da die Tyrosylprotein Sulfotransferase noch nicht gereinigt ist und demzufolge bisher keine Antikörper erzeugt werden konnten, war diese Methode nicht durchführbar. Der in dieser Arbeit durchgeführte "zellbiologische" Ansatz hat

mehrere Vorteile gegenüber EM-immunocytochemischen Methoden. Zum einen werden Enzymaktivitäten und nicht nur Enzymmoleküle lokalisiert. Zum anderen werden die meisten Untersuchungen in vivo durchgeführt.

2.4. Tyrosinsulfatierung im trans Golgi Netzwerk

Im trans Golgi Kompartiment sind neben den Sulfotransferasen noch andere kovalent modifizierende Enzyme spezifisch lokalisiert. Dies sind Galaktosyl- (Roth und Berger, 1985), Sialyl- (Roth et al., 1985; Geuze et al., 1985) und Fukosyltransferase(n) (Goldberg und Kornfeld, 1983) - Enzyme, die N-gebundene Oligosaccharide, deren Mannosereste zum Großteil entfernt wurden, terminal glykosylieren. Bei diesen Reaktionen wird nicht direkt ein Aminosäurerest, sondern eine bereits bestehende Modifikation eines Aminosäurerestes sekundär weiter modifiziert. Tyrosinsulfatierung ist die erste primäre Aminosäuremodifikation, die im trans Golgi Kompartiment lokalisiert werden konnte.

Für keine der trans Golgi spezifischen Modifikationen ist bisher Evidenz vorhanden, daß sie für das modifizierte Protein bereits im trans Golgi Kompartiment funktionell von Bedeutung sind. In der Regel rüsten terminale Glykosylierungsreaktionen Proteine für ihre zukünftige Umgebung aus, wo z.B. die Präsenz von Sialinsäure über die Lebensdauer eines Glykoproteins im Serum mit entscheidet

(siehe Schauer, 1985). Eine mögliche Erklärung für die spezifische Lokalisierung der terminal glykosylierenden Enzyme im trans Golgi Kompartiment ist, daß sie am Ende des vektoriellen Transportes stehen müssen, um so eine korrekte Struktur der Oligosaccharide zu gewährleisten. Der vektorielle Transport ist mit einer vektoriellen Modifizierung der Oligosaccharide gekoppelt, wobei ein folgender enzymatischer Schritt von einem vorhergehenden abhängig ist. Dies trifft nicht für eine primäre Aminosäuremodifikation zu. Sie könnte wie im Falle der N-Glykosylierung auch an der naszierenden Polypeptidkette stattfinden. Besonders für die Tyrosinsulfatierung stellt sich die Frage wieso sie spezifisch im trans Golgi Kompartiment lokalisiert sein muß. Eine wichtige Funktion des trans Golgi Kompartiments ist neben der terminalen Glykosylierung von Proteinen das Aussortieren von lysosomalen, Plasmamembran- und sekretorischen Proteinen in spezifische Transportvesikel. Es ist daher denkbar, daß Tyrosinsulfatierung von Proteinen bei diesem Aussortierungsprozess beteiligt ist.

Es fällt auf, daß die meisten der kovalenten Modifikationen, die sekretorische Proteine azider machen, im trans Golgi Kompartiment⁶ lokalisiert sind. Das trifft für die Sialylierung (Roth et al., 1985; Geuze et al., 1985), eine Art der Phosphorylierung (Rosa und Huttner, unpubliziert) und die Sulfatierung von Tyrosin- und Kohlenhydratresten zu. Anderson und Pathak (1985) zeigten, daß der pH-Wert im trans

Golgi Kompartiment azide und damit niedriger als der anderer Subkompartimente des Golgi Apparates ist. Es ist daher möglich, daß allen Modifikationen, die sekretorische Proteine saurer machen, eine gemeinsame Funktion im trans Golgi zukommt, z.B. die Löslichkeit sekretorischer Proteine bei erniedrigtem pH-Wert zu gewährleisten, um beispielsweise die Kopräzipitation mit lysosomalen Enzymen zu vermeiden.

2.5. Die Transportkinetik von pulsmarkiertem IgM

Nach Pulsmarkierung mit radioaktiven Aminosäuren im rER wurden für viele Proteine Transportraten gemessen, die einer Kinetik Erster Ordnung entsprachen und die für einzelne Proteine unterschiedlich waren (Fitting und Kabat, 1982; Lodish et al., 1983; Fries et al.; 1984). Es wurde aus diesen Beobachtungen geschlossen, daß es Schritte im intrazellulären Transport der Proteine geben muß, die die Sekretionsraten limitieren. Demzufolge ist der intrazelluläre Transport von Proteinen nicht mit einem kontinuierlichen Abfließen vergleichbar. Vielmehr wurde die Existenz von Rezeptoren postuliert, mit denen die Proteine während ihres intrazellulären Transportes wechselwirken und die ihnen charakteristische Sekretionskinetiken verleihen (Lodish et al., 1983). Ein limitierender Schritt, der die Sekretionsraten viraler Proteine beeinflusste, wurde z.B. zwischen rER und cis Golgi lokalisiert (Fitting und Kabat, 1982).

Durch Pulsmarkierung von IgM mit Galaktose und Sulfat konnte untersucht werden, ob ein solcher Schritt auch zwischen dem trans Golgi Kompartiment und der Zelloberfläche existiert. Die durchgeführten Puls-Chase-Experimente mit trans Golgi-spezifischen Markierungen haben ergeben, daß ein limitierender Transportschritt zwischen trans Golgi Netzwerk und Zelloberfläche existiert. Mit Sulfat und Galaktose pulsmarkiertes IgM wurde mit einer Kinetik Erster Ordnung sekretiert. Eine solche Kinetik ist für eine monomolekulare Reaktion typisch, bei der die Konzentration der Ausgangskomponente die Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt (Abb.2.12b.). In diesem Fall besteht die Reaktion in der Translokation einer Komponente. Puls-markierte IgM-Moleküle strömen nicht einfach ungehindert vom trans Golgi zur Zelloberfläche, sondern stauen sich an. Dabei müssen sie mit unmarkierten IgM-Molekülen um einen Weitertransport konkurrieren. Dadurch entsteht die Konzentrationsabhängigkeit, die sich in der Kinetik Erster Ordnung ausdrückt. Der limitierende Schritt könnte z.B. dem Aussortierungsprozess entsprechen. Eine andere Möglichkeit ist, daß pulsmarkiertes IgM in Transportvesikeln (nach Abschnürung vom trans Golgi Netzwerk) mit Transportvesikeln, die unmarkiertes IgM enthalten, um eine Transportmöglichkeit zur Zelloberfläche konkurrieren muß, z.B. entlang eines Mikrotubulus.

K A P I T E L 3

DIE KONSENSUSSTRUKTUR DER TYROSINSULFATIERUNG

EINFÜHRUNG

Nachdem die Tyrosylprotein Sulfotransferaseaktivität im trans Golgi Kompartiment lokalisiert werden konnte, war es nun von Interesse zu untersuchen, welche Voraussetzungen ein Protein erfüllen muß, um in diesem Kompartiment sulfatiert zu werden. Die erste Voraussetzung ist sicherlich die, daß das Protein das Innere dieses Kompartiments erreichen muß. Nur Proteine, die am Rauhen Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und dabei durch die Membran transloziert werden (siehe Hortsch und Meyer, 1986), und die dann nicht als spezifische Komponenten des rER, cis oder medialen Golgi zurückgehalten werden, können den trans Golgi erreichen und sulfatiert werden. Für die Tyrosinsulfatierung dieser Proteine (theoretisch sind dies trans Golgi-spezifische Komponenten, lysosomale Proteine, Plasmamembranproteine und sekretorische Proteine) dürften zwei Faktoren eine wichtige Rolle spielen:

(1) Die Konsensussequenz

Für einige kovalent modifizierenden Enzyme ist gezeigt worden, daß eine kurze, spezifische Aminosäuresequenz im Proteinsubstrat festlegt, ob ein Aminosäurerest modifiziert

werden kann. Bei der N-Glykosylierung werden z.B. nur Asparaginreste modifiziert, bei denen mit einer Aminosäure Abstand ein Serin- oder Threoninrest folgt (-Asn-X-Ser/Thr-; siehe Kornfeld und Kornfeld, 1985). Bei der Phosphorylierung durch die cyclo-AMP-abhängige Proteinkinase werden z.B. nur Serin- oder Threoninreste modifiziert, die N-terminal zwei basische Aminosäuren (Arginin oder Lysin) mit einem Abstand von ein bis zwei Aminosäuren haben (siehe Rosen und Krebs, 1982). In Analogie mit diesen Modifikationen wird auch bei der Tyrosinsulfatierung erwartet, daß eine bestimmte Primärstruktur determiniert, welche Tyrosinreste modifizierbar sind. In diesem Kapitel wird daher versucht durch einen Vergleich aller bereits identifizierten Tyrosinsulfatierungsstellen eine Konsensussequenz zu ermitteln, die die Vorhersage von Tyrosinsulfatierungsstellen aus Primärsequenzdaten von Proteinen ermöglichen soll.

(2) Die Konsensusstruktur

Die meisten potentiellen Proteinsubstrate der Tyrosylprotein Sulfotransferase sind bereits kovalent modifiziert worden, bevor sie das trans Golgi Kompartiment erreicht haben, z.B. durch N-Glykosylierung, Disulfidbrückenbildung und/oder O-Glykosylierung. Solche Modifizierungen sind sicherlich wichtige strukturelle Veränderungen des Proteinsubstrates, die über die Zugänglichkeit einer potentiellen Tyrosinsulfatierungsstelle, wie sie primär durch eine Konsensussequenz festgelegt wurde, entscheiden. Da die

Tyrosinsulfatierung an einem fertig gefalteten, hoch strukturierten Protein stattfindet, wird erwartet, daß nicht nur Primärstruktur, sondern auch Sekundär-, Tertiär und Quartärstruktur für die Modifizierbarkeit des Proteins eine Rolle spielen. Aus diesen Gründen wurde hier der Begriff "Konsensusstruktur" eingeführt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.1. Ableitung einer Konsensusstruktur der Tyrosinsulfatierung

In Dotterprotein 2 (siehe Kapitel 6) ist das sulfatierte Tyrosin 172 in der längsten hydrophilen Domäne des Proteins gelegen (Abb.3.1.), die nahezu ausschließlich Aminosäuren mit Carboxy-, Hydroxy- und Amidofunktionen enthält (Abb.6.7.). Tyrosin 172 grenzt N-terminal an einen Aspartatrest, was auch bei vielen der bereits identifizierten Tyrosinsulfatierungsstellen (Abb.3.2.) zu beobachten ist. Daß die Lage in einer hydrophilen Domäne oder die Nachbarschaft saurer Aminosäuren nicht alleine für die Kennzeichnung einer Tyrosinsulfatierungsstelle ausreicht, wird deutlich, wenn zum einen andere unsulfatierte Tyrosinreste in Dotterprotein 2 betrachtet werden, die gleichfalls in hydrophilen Regionen und in der Nachbarschaft saurer Aminosäuren vorkommen (siehe Abb.3.4.) und zum anderen, wenn andere sekretorische Proteine, die nicht sulfatiert vorkommen (z.B. Serumalbumin und Transferrin; Hille et al., 1984), nach solchen Tyrosinresten durchgesehen werden: Tyrosinreste, die an Glutamat- oder Aspartatreste angrenzen und die in hydrophilen Regionen liegen sind relativ häufig, wie eine Suche in der Proteindatenbank des EMBL (Barker et al., 1986) ergeben hat.

Unter der Annahme, daß die Tyrosylprotein Sulfotransferasen

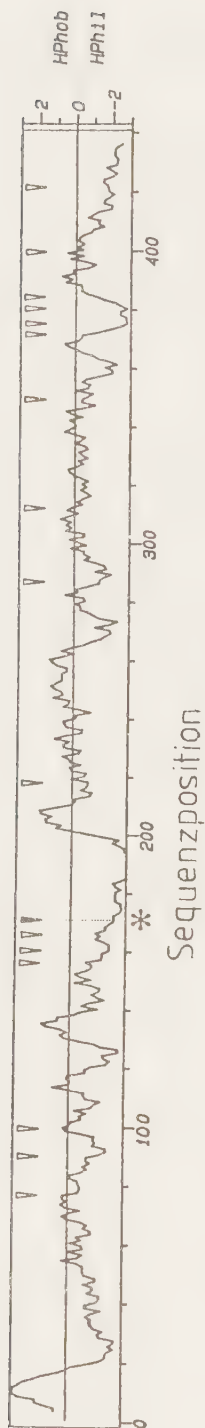


Abb.3.3. : Hydropathieprofil von Dotterprotein 2.
 In dem Hydropathieprofil nach Kyte und Doolittle (1982) sind die Positionen aller Tyrosinreste mit Pfeilen eingezeichnet. Der ausgefüllte Pfeil dessen Position mit einem Stern und einer gepunkteten Linie gekennzeichnet ist, entspricht dem sulfatierten Tyrosin 172.

Protein	Spezies	Tyrosinsulfatierungs- stelle		
		-7	-10 +1	+7
Dotterprotein 2	Fruchtfliege	Q P Y E T T D Y	S N E E E Q S Q	
Komplement C4	Maus	T M E A N E D Y	E D Y E Y D E	
		A N E D Y E D Y	E Y D E L P A	
		E D Y E L Y E Y D E L F A F E		
Antiplasmin	Mensch	V P P M E E D Y	P Q F G S P K	
Heparin Kofaktor II	Mensch	E G E E D D D Y	L D L E K I F	
		I F S E D D D Y	I D I V D S L	
CCK-Vorläufer	Mensch	H R I S D R D Y	M G W M D F G	
C-terminales Peptid des CCK-Vorläufers	Mensch	G R R S A E E Y E Y P S*		
		R S A E E Y E Y P S*		
	Ratte	G R R S A E D Y E Y P S*		
		R S A E D Y E Y P S*		
Hirudin	Blutegel	F E E I P E E Y	L Q*	
Caerulein-Vorläufer	Frosch	F A D G Q Q D Y	T G W M D F G	
Fibrinopeptide	Kuh	* Q F P T D Y	D E G Q D D D R	
	Yak	* R F P T D Y	D E G Q D D D R	
	Schaf	* G Y L D Y	D E V D D N R	
	Pferd	* L D Y	D H E E E D G	
	Zebra	* L D Y	D H E E E D G	
	Rentier	* Q H L A D Y	D E V E D D R	
	Elefant	* A T D Y	E D E E F P G	
	Kamel	* A T D Y	D E E E D D R	
	Schwein	* A I D Y	D E D E D G R	
	Tapir	* L S D Y	D E E E D E R	
	Känguruh	* S F D Y	D D D T G - -	
	Kaninchen	* A D D D Y	D D E V L P D	
	Katze	* I I D Y	Y D E G E E D	
		* I I D Y Y	D E G E E D R	
	Neunauge	V G Q P E N D Y	D T G D D A -	
	Hund		* H Y Y D D T D E E	
			* H Y Y D D T E E E	
Faktor X	Kuh	D A S E L E H Y	D P A D L S P	
Gastrin-Vorläufer	Mensch	L E E E E E E A Y	G W M D F G -	
	Ratte	L E E E E E E A Y	G W M D F G -	
	Kuh	V E E A E E E A Y	G W M D F G -	
	Schwein	M E E E E E E A Y	G W M D F G R	
	Hund	M E E A E E E A Y	G W M D F G -	
	Katze	L E E E E E A A Y	G W M D F G -	
Phyllokinin-Vorläufer	Frosch	G F S P F R I Y	- - - - -	
Leu-Enkephalin-Vorläufer	Maus	W M D Y Q K R Y	G G F L K R F	

Abb.3.2.: Vergleich aller bisher bekannten Tyrosinsulfatierungsstellen. Alle bereits identifizierten Tyrosinsulfatierungsstellen in Proteinen und Peptiden sind mit dem sulfatierten Tyrosin in Position 0 untereinander gelistet. Zusätzlich sind jeweils 7 Aminosäuren N- und C-terminal abgebildet. Saure Aminosäuren sind eingerahmt. Glycin- und Prolinreste sind unterstrichen. N- und C-Termini sind mit einem Stern markiert. Noch nicht identifizierte Aminosäuren sind durch einem Strich ersetzt. Tyrosinsulfatreste, die sich nicht in Position 0 befinden, tragen ein schwarzes Dreieck. Literaturhinweise sind der Tabelle E1 zu entnehmen.

in verschiedenen Geweben und verschiedenen Spezies die gleiche Substratspezifität haben (vgl. Transfektionsexperimente mit Dotterprotein 2, die in Kapitel 6 diskutiert werden), können aus einem Vergleich der bisher identifizierten Tyrosinsulfatierungsstellen (Abb.3.2.) folgende Eigenschaften der Konsensusstruktur der Tyrosinsulfatierung abgeleitet werden.

3.1.1. Hydrophile Domänen.

Um für das modifizierende Enzym zugänglich zu sein, muß der relativ hydrophobe Tyrosinrest an der Oberfläche des Proteins exponiert werden. Dies kann durch benachbarte geladene und andere hydrophile Aminosäureseitengruppen erreicht werden. Eine der Funktionen saurer Aminosäuren, die in der Umgebung sulfatierter Tyrosinreste sehr häufig sind (Abb.3.2.), kann die Exponierung des Tyrosinrestes sein.

3.1.2. Saure Aminosäuren.

Wahrscheinlich sind die Seitengruppen der Aminosäuren Aspartat und Glutamat essentielle Teile der Konsensussequenz. Hätten sie nur die Funktion, den Tyrosinrest zu exponieren, wären sie in der Evolution sicherlich häufiger durch geladene, basische Aminosäuren ersetzt worden. Basische Aminosäuren sind jedoch relativ selten in der nahen Umgebung sulfatierter Tyrosinreste und scheinen nur in den Peptiden Leu-Enkephalin und Phyllokinin

saure Reste zu ersetzen (Abb.3.2). Auffällig ist, daß in nahezu allen bekannten Tyrosinsulfatierungsstellen in den Positionen -5 bis +5 um den sulfatierten Tyrosinrest mindestens drei saure Aminosäure vorkommen. Dabei können Serien von sauren Resten sowohl N-terminal (Abb.3.2.; Gastrine) als auch C-terminal (Abb.3.2.; Fibrinopeptide) von dem Tyrosinrest vorkommen. Mit Ausnahme der Gastrine und dem Faktor X kommt in der Position -1 immer eine saure Aminosäure, bevorzugt Aspartat, vor (Abb.3.2.). Die Tyrosinsulfatierungsstellen, die in Position -1 keine saure Aminosäure haben (Faktor X und Gastrine) sind substöchiometrisch sulfatiert (siehe Tab.E2).

Carboxylgruppen können in Proteinen an der Bindung von divalenten Kationen beteiligt sein. Der Befund, daß die Sulfopeptide von Dotterprotein 2 offenbar im Komplex mit Calcium vorlagen (siehe Kapitel 6), lässt an die Möglichkeit denken, daß divalente Kationen im Komplex mit Aminosäuresequenzen an der Ausbildung einer Konsensussequenz für die Tyrosinsulfatierung beteiligt sind. Nach der Sulfatierung könnte der Tyrosinrest selbst an der Bindung divalenter Kationen beteiligt sein.

3.1.3. Die An- oder Abwesenheit anderer Aminosäurereste.

Wie unter 3.1.4. diskutiert wird, findet sich in keiner der bekannten Tyrosinsulfatierungsstellen in den Positionen -7 bis +7 um den sulfatierbaren Tyrosinrest ein Cysteinrest (Abb.3.2.). Wie unter 3.1.6. diskutiert wird, sind die

Aminosäuren Serin, Asparagin, Glycin und Prolin relativ häufig in den Positionen -7 bis +7 anzutreffen.

Basische Aminosäuren wie auch hydrophobe Aminosäuren sind in der näheren Umgebung des sulfatierten Tyrosinrestes relativ selten. Es ist möglich, daß benachbarte basische Aminosäuren mit essentiellen sauren Aminosäuren ionische Wechselwirkung eingehen, die die Konsensusstruktur zerstören würden.

3.1.4. Die Abwesenheit von Disulfidbrücken

Die meisten Cysteinreste sekretorischer Proteine sind an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt (siehe Freedman, 1984). Demnach ist die Anwesenheit eines Cysteinrestes innerhalb des untersuchten Sequenzabschnittes in den meisten Fällen gleichbedeutend mit der Anwesenheit einer Disulfidbrücke. Da in keiner der bisher identifizierten Tyrosinsulfatierungsstellen Cysteinreste in den Positionen -7 bis +7 zu finden sind, liegt nahe daß sich eine Disulfidbrücke störend auf die Exposition einer Tyrosinsulfatierungsstelle auswirken kann, die ansonsten die Konsensussequenz erfüllen würde (vgl. Diskussion in Kapitel 2).

3.1.5. Die Abwesenheit von N-Glykosylierungsstellen

In keiner der bekannten Tyrosinsulfatierungsstellen kommen die Sequenzen NXS oder NXT vor, die als Erkennungssequenz

für die Oligosaccharyltransferase im rER dienen (siehe Kornfeld und Kornfeld, 1985). Wahrscheinlich stellt die Anwesenheit eines N-gebundenen Oligosaccharides in der näheren Umgebung sulfatierbarer Tyrosinreste eine sterische Behinderung für das sulfatierende Enzym dar. Der einzige Tyrosinrest in IgG2a, der in Position -1 und -2 saure Aminosäuren besitzt (Tyrosin 179; siehe Abb.3.5.), hat in Position +1 eine N-Glykosylierungsstelle, an die das einzige Oligosaccharid im konstanten Teil der Schwere Kette angeknüpft ist. In Kapitel 4 soll untersucht werden, ob nach Hemmung der N-Glykosylierung des IgG2a eine de novo Tyrosinsulfatierung in vivo stattfinden kann.

3.1.6. Die Anwesenheit "turn"-induzierender Aminosäuren

Allen bekannten Tyrosinsulfatierungsstellen ist gemeinsam, daß zwischen den Positionen -7 und +7 um den sulfatierten Tyrosinrest Aminosäuren vorkommen, die die Tendenz haben "Turn"-Strukturen, d.h. Unterbrechungen von alpha-Helices oder beta-Faltblattstrukturen, zu induzieren. Die Aminosäuren, die das größte Potential haben einen Knick ("Turn") in einer Polypeptidkette zu bewirken sind Prolin und Glycin, gefolgt von Aspartat, Serin und Asparagin (Palau et al., 1982). In nahezu jeder Tyrosinsulfatierungsstelle kamen Prolin- und Glycinreste in den Positionen -7 bis +7 vor (Abb.3.2., unterstrichene Aminosäuren). Es fiel auf, daß Prolin und Glycin nie in Position -1 vorkam. Die drei anderen Aminosäuren mit starkem "turn"-induzierendem

Potential, Aspartat, Serin und Asparagin, kamen zusätzlich und in sehr wenigen Fällen auch an Stelle von Glycin und Prolin vor (Abb.3.2.). Wenn die Präferenzen für die Ausbildung von alpha-helicaler, beta-Faltblatt- und beta-"Turn"-Struktur für die ersten acht Tyrosinsulfatierungsstellen in Abb.3.2. einschließlich der für Faktor X berechnet wurden (alle nicht an C- oder N-Termini gelegen) (nach Argos et al., 1983), ergab sich, daß die Ausbildung einer "Turn"-Struktur zwischen den Positionen -7 bis +7 am wahrscheinlichsten war. Die Anwesenheit von mehreren "turn"-induzierenden Aminosäuren dürfte dazu führen, daß in der Umgebung von sulfatierbaren Tyrosinresten wenig Sekundärstruktur existiert und daher die Konsensussequenz in einer Art Schleife dem Enzym linear präsentiert ist.

Bei den Gastrinen wurde gefunden, daß eine hohe Präferenz zur Ausbildung einer alpha-helicalen Struktur auf der N-terminalen Seite des Tyrosinrestes besteht. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Gastrine durch eine Tyrosylprotein Sulfotransferase mit anderer Substratspezifität sulfatiert werden.

Viele der Tyrosinsulfatierungsstellen sind in der Nähe des N- oder C-Terminus lokalisiert, was offenbar die Notwendigkeit mindert, viele "turn"-induzierende Aminosäuren in der Nähe des Tyrosinrestes zu haben (Abb.3.2.).

Die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteinsequenz, in die

ein Tyrosinrest eingebettet ist, ist offenbar von großer Bedeutung. In vitro Sulfatierungsstudien mit einem Polymer aus 62% Glutamat, 30% Alanin und 8% Tyrosin als Substrat (Lee und Huttner, 1985) unterstützen diese Vermutung. Obgleich in diesem Polymer sehr viele saure Aminosäuren vorhanden sind und die Tyrosinreste in hydrophilen Domänen exponiert sein müssten, waren nur eine geringe Anzahl der Tyrosinreste eines Polymermoleküls sulfatierbar. Da in dem Polymer keine potentiell alpha-Helix-brechenden Aminosäuren vorhanden sind, ist es denkbar, daß z.B. nur Tyrosinreste in der Nähe des N- oder C-Terminus sulfatiert werden konnten.

3.2. Zusammenfassung der Beobachtungen zu einer Konsensusstruktur

Die Konsensussequenz (nicht -struktur) der Tyrosinsulfatierung scheint sehr einfach zu sein. In den meisten der untersuchten Fälle ist sie -D/E-Y-. Seltener kommen -Y-D/E- und -D/E-X-(X)-Y- vor, wobei die letztere Sequenz vielleicht durch ein Enzym mit anderer Substratspezifität erkannt wird. Die Konsensussequenz für die N-Glykosylierung ist ebenfalls ein Beispiel für eine sehr einfache Konsensussequenz (-N-X-S/T-; siehe Kornfeld und Kornfeld, 1985). Im Gegensatz zur Tyrosinsulfatierung findet hier die Modifizierung an der naszierenden Polypeptidkette statt (siehe Kornfeld und Kornfeld, 1985). Dabei ist die Primärsequenz in einem noch nicht



Abb.3.3.: Zusammenfassung von Merkmalen der Konsensussequenz der Tyrosinsulfatierung. Die gemeinsamen Charakteristika in der Umgebung sulfatierter Tyrosinreste wurden aus dem Vergleich der bisher bekannten Tyrosinsulfatierungsstellen (Abb.3.2.) abgeleitet.

dreidimensional gefalteten und noch nicht modifizierten Protein linear präsentiert. Im Falle der Tyrosinsulfatierung, die an einem hoch strukturierten Polypeptid stattfindet, müssen daher die umgebenden Aminosäuren auch die Funktion erfüllen den Tyrosinrest zu exponieren. Dies kann offenbar durch die Anwesenheit von Aminosäuren mit "turn"-induzierendem Potential, die Lokalisierung des Tyrosinrestes an N- oder C-Terminus und durch die Anwesenheit weiterer saurer Aminosäuren in unbestimmten Positionen innerhalb der Positionen -5 bis +5 erreicht werden. Den sauren Aminosäuren kommt dabei wahrscheinlich noch eine spezifischere Funktion bei der Substraterkennung zu, da sie sehr häufig sind und in der Regel nicht durch basische Aminosäurereste ersetzt sind. Die Beobachtung, daß die Primärsequenzen in der weiteren Umgebung der Konsensussequenzen -D/E-Y-, -Y-D/E- und -D/E-X(X)-Y- stark degeneriert sind (Abb.3.2.), ist dadurch erklärbar, daß die Aminosäuren dort nur die Funktion haben, den Tyrosinrest zu exponieren. Eine bestimmte Aminosäurezusammensetzung innerhalb der Positionen -7 bis +7 scheint für diesen Zweck ausreichend zu sein. Die Anwesenheit von Oligosacchariden und Disulfidbrücken könnte sich störend auf die Exponierung des Tyrosin auswirken. Dies ist wahrscheinlich der Grund dafür, daß keine Cysteinreste und keine N-Glykosylierungsstellen in der näheren Umgebung der Tyrosinsulfatierungsstellen konserviert wurden. Die hier aufgeführten Beobachtungen sind in Abb.3.3. zusammengefasst dargestellt.

3.3. Anwendung der Konsensusstruktur

Zunächst wurde versucht zu erklären, warum nur einer der sechs Tyrosinreste, die im Dotterprotein 2 in der Umgebung azider Aminosäuren gelegen sind, sulfatiert wird (Abb.3.4.). Mit Ausnahme des Restes 172 haben alle anderen Tyrosinreste zu wenig saure Aminosäuren zwischen den Positionen -5 und +5. Auch scheint mit Ausnahme von Tyrosin 172 die Anzahl "turn"-induzierender Aminosäuren zu niedrig (Tyr 220) oder deren Position zu ungünstig (Tyr 92, Tyr 163, Tyr 401).

Die abgeleitete Konsensusstruktur wurde weiterhin verwendet, um in einigen tyrosinsulfatierten Proteinen (Tab.E2), deren Tyrosinsulfatierungsstellen noch nicht identifiziert worden sind, diese vorherzusagen (Abb.3.5). Nähere Einzelheiten zu IgM und IgG2a werden in den Kapiteln 2 bzw. 4 diskutiert.

Um Proteine zu finden, die potentiell an Tyrosin sulfatiert vorkommen könnten, wurden aus einer Proteinsequenzdatenbank (Baker et al., 1986) Proteine mit den Sequenzen -D/E-Y-, -D/E-X-Y- und -Y-D/E- aussortiert. Davon wurden nur sekretorische Proteine von Eukaryonten (siehe Kapitel 1) weiter untersucht, ob sie den Anforderungen, die in Abb.3.3. zusammengefasst sind, entsprechen. Obgleich anfänglich sehr viele Proteine gefunden wurden, wiesen nach weiterer Durchsicht nur sehr wenige genügend saure Aminosäuren oder genügend "turn"-induzierende Aminosäuren in der Umgebung des Tyrosinrestes auf. Eine Auswahl der so gefundenen Proteine ist in Abb.3.7. aufgeführt. Keines dieser Proteine wurde

"Azide" Tyrosinreste in Dotterprotein 2	Sequenzposition	sulfatiert in vivo	erfüllen die Bedingungen für die Konsensusstruktur in Abb.5.17.
-7	-10 +1		
Q P Y E T T D Y S N E E Q S Q	172	+	ja
N H V F K P D Y T P E P S Q I	92	-	nein, zu wenig saure AS
Q R Y N L Q P Y E T T D Y S N	162	-	nein, P in Position -1, zu wenig saure AS
A I E D F E Q Y A T L N I E R	220	-	nein, kein D/E in -1, zu wenig "turn"-induz. AS
A A S S Y Q E Y K Q N K G Y G	377	-	nein, zu wenig saure AS
D F D L Q G D Y I L Q V N S K	401	-	nein, zu wenig saure AS

Abb.3.4. : Vergleich "saurer" Tyrosinreste im Dotterprotein 2.
Sechs Domänen des Dotterprotein 2 sind mit Tyrosinresten untereinander gelistet (+/-
7 Aminosäurereste), die N- oder C-terminal an Glutamat- oder Aspartatreste angrenzen.
Die Sequenzen sind Hung und Wensink (1982) entnommen (siehe Abb.6.7.). Saure
Aminosäuren sind eingerahtmt. Prolin- und Glycinreste sind unterstrichen.

Protein		Spezies		Vorgeschlagene Tyrosinrestsequenz
Fibronectin		Mensch		V S G R K V E Y E L S E E E D
Vitronectin/S-Protein		Mensch		I P R E D V E Y H L Y P H S R
Dotterprotein 1		Fruchtfliege		F T M P E S E Y T V I D D C E
Immunoglobulin G2a (γ -Kette)		Maus		G A N N Y E D Y R M D W L F A
Immunoglobulin M (μ -Kette)		Maus		R I S S E E D Y S E E V K H A
				S K N G N Q D Y Q D G S N E Q
				A H D L E G D Y I L Q V N P K
				T Q T H R E L Y M S T L R V V
				I L E G S D E Y L V C K I H Y

Abb.3.5. : Voraussage von Tyrosinsulfatierungsstellen in Proteinen.
A. In Proteinen, die tyrosinsulfatiert sind, aber in denen die Sequenzposition des sulfatierten Tyrosinrestes noch nicht bekannt ist.
Von den Proteinen in Tab. E1, von denen die Sequenzposition des sulfatierten Tyrosinrestes noch nicht bekannt ist, wurden Sequenzdaten aus der "protein Identification Resource" (Baker et al., 1986) nach den Merkmalen in Abb.3.3. untersucht. Details zur Illustration sind der Abb.3.2. zu entnehmen.

Protein

Spezies

hypothetische
Tyrosinsulfatierungs-
stelle

		-7	-1	0	+1	+7										
Alpha-s2-Kasein	Kuh	R	N	A	N	E	E	E	Y	S	I	G	S	S	S	E
		L	N	E	I	N	E	E	Y	Q	K	F	P	Q	Y	L
Alpha-2u-Globulin Vorl.	Ratte	D	G	E	Y	F	V	E	Y	D	G	G	N	T	F	T
		K	T	P	E	D	G	E	Y	F	V	E	Y	D	G	G
Caeruloplasmin	Mensch	A	V	E	V	E	W	D	Y	S	P	Q	R	E	W	E
Choriomammotropin Vorl.	Mensch	D	T	S	D	S	D	D	Y	H	L	L	K	D	L	E
Komplement Faktor B	Mensch	G	I	P	E	F	Y	D	Y	D	V	A	L	I	K	L
Epidermaler Wachstumsfaktor Vorl.	Maus	G	M	V	F	A	L	D	Y	D	V	P	E	S	K	I
Eilege-Hormon Vorl.	Aplysia	F	D	K	S	S	R	D	Y	D	D	N	G	E	D	V
Faktor IX Vorl.	Mensch	A	V	F	P	D	V	D	Y	V	N	P	T	E	A	E
Hämocyanin (d-Kette)	Tarantel	L	F	V	M	L	T	D	Y	E	E	D	S	V	Q	G
Lysozym	Schwan	I	G	T	T	H	D	D	Y	A	N	D	V	V	A	R
Melanotropin-β Vorl.	Fisch	*	D	G	D	D	Y	K	F	G	H	F	R	W		
Pankreatisches Hormon Vorl.	Schaf	*	A	S	L	E	L	E	Y	P	G	D	N	A	T	P
Plasminogen	Mensch	*	E	P	L	D	D	Y	V	N	T	Q	G	A	S	
Proinsulin Vorl.	Hühnchen	L	P	F	Q	Q	E	E	Y	E	K	V	K	R	G	I
prokallikrein Vorl.	Maus	I	Q	N	P	Q	D	D	Y	S	Y	D	L	M	L	L

Abb.3.6. : Voraussage von Tyrosinsulfatierungsstellen in Proteinen.

B. In Proteinen, von denen nicht bekannt ist, ob sie tyrosinsulfatiert sind.

Die Proteinsequenzdatenbank "Protein Identification Resource" (Baker et al., 1998) enthält nach den Sequenzen -DY-, -EY-, -DXY-, -EY-, -YL- und -IL- durchsucht. Von den gefundenen Proteinen wurden nur tierische weiter daraufhin untersucht, ob sie die gefundenen Merkmale erfüllen. Eine Auswahl der gefundenen Proteine ist in Abb.3.3. dargestellt. Die Proteine, die für die Sulfatierung geeignet sind, sind in der Abb.3.2. zu entnehmen.

meines Wissens nach bisher auf Tyrosinsulfatierung hin untersucht.

K A P I T E L 4

DER EINFLUSS DER N-GLYKOSYLIERUNG AUF DIE TYROSINSULFATIERUNG
VON PROTEINEN

EINFÜHRUNG

Im vorangehenden Kapitel wurde eine Konsensusstruktur für die Tyrosinsulfatierung vorgeschlagen. In keiner der bisher identifizierten Tyrosinsulfatierungsstellen konnte dabei eine potentielle N-Glykosylierungsstelle gefunden werden. Es wurde daher die Möglichkeit diskutiert, daß die Anwesenheit einer großen Aminosäuremodifikation im Protein, wie sie ein N-gebundenes Oligosaccharid darstellt, potentiell sulfatierbare Tyrosinreste für die Sulfotransferase unzugänglich macht. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde eine Hybridomazelllinie, die Immunoglobulin G2a sekretiert, mit einem Hemmer der N-Glykosylierung behandelt. Es wurde beobachtet, daß im konstanten Teil des IgG2a (und 2b) ein Tyrosinrest, der partiell die vorgeschlagene Konsensusstruktur erfüllt, vorkommt (saure Aminosäuren in Position -1 und -2; siehe Abb.3.5.). An diesen Tyrosinrest schließt sich C-terminal eine N-Glykosylierungsstelle an, deren Asparaginrest das einzige N-gebundene Oligosaccharid der konstanten Region trägt. Da der Golgi Apparat kovalente

Modifizierungsreaktionen subkompartimentiert und ihre zeitliche Aufeinanderfolge determiniert, sollte in der Abwesenheit einer während des intrazellulären Transport früh vorkommenden Modifizierungsreaktion, wie der N-Glykosylierung, die An- oder Abwesenheit der später auftretenden Tyrosinsulfatierung beeinflußt werden. Wenn die N-Glykosylierung im rER blockiert wird, sollte daher ein Tyrosinrest im konstanten Teil der Schwere Kette des IgG2a für die Tyrosylprotein Sulfotransferase im trans Golgi zugänglich werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Immunglobulin G2a (IgG2a), das von der Maushybridomazelllinie M 31 sekretiert wird, wurde (^{35}S)Sulfat kovalent in die Schwere Kette inkorporiert. Das Sulfat war weder an Tyrosin- noch an Serin- oder Threoninresten gebunden, sondern schien sich in einem N-gebundenem Oligosaccharid im F_{ab} -Teil der Schwere Kette zu befinden. Das N-gebundene Oligosaccharid im F_c -Teil der Schwere Kette hingegen war unsulfatiert. Nicht glykosyliertes IgG2a, das in der Anwesenheit von Tunicamycin, einem Hemmer der N-Glykosylierung, sekretiert wurde, war nicht unsulfatiert, sondern inkorporierte viermal mehr radioaktives Sulfat als Kontroll-IgG. Dieses Sulfat war im F_c -Teil der Schwere Kette lokalisiert und war hauptsächlich an Tyrosinresten gebunden. Die Tyrosinsulfatierung als auch die Kohlenhydratsulfatierung waren substöchiometrisch. In dem hier untersuchten Beispiel scheint die Anwesenheit eines N-gebundenen Oligosaccharides in der Tat eine Tyrosinsulfatierung verhindert zu haben.

ERGEBNISSE

4.1. Die Schwere Kette eines Hybridoma Immunoglobulin G2a ist sulfatiert.

Hybridomazellkulturen wurden entweder mit (^3H)Tyrosin oder (^{35}S)Sulfat markiert und sekretiertes IgG2a aus den Kulturüberständen durch Protein A-Sepharose affinitätsgereinigt. Das IgG wurde unter reduzierenden (Abb.4.1., a und b) und unter nicht reduzierenden Bedingungen (Abb.4.1., c und d) auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert und die Gele anschließend fluorographiert. IgG enthielt radioaktives Sulfat in der Schwere Kette. Dies ist durch die Anwesenheit einer sulfatmarkierten Bande von 55 kDa gezeigt, die man nach Protein A-Affinitätsreinigung (Abb.4.1., b) und nach Affinitätsreinigung mit Hilfe des Antigens (nicht abgebildet) findet. In der leichten Kette des IgG war kein Sulfat nachweisbar, selbst nicht nach längerer Fluorographiezeit oder Szintillationszählung. Zusätzlich zu der Schwere Kette von 55 kDa wurde in reduzierenden Gelen eine sulfatmarkierte Bande von 60 kDa beobachtet (Abb.4.1., b). Im Vergleich zur 55kDa-Bande inkorporierte die 60 kDa-Bande nur wenig (^3H)Tyrosin (Abb.4.1., a) und war nur in sehr geringen Mengen vorhanden, wie nach Färbung mit Coomassie Blau zu sehen war (nicht abgebildet). In nicht reduzierenden Gelen fand sich die Sulfatmarkierung ausschließlich in der Position des

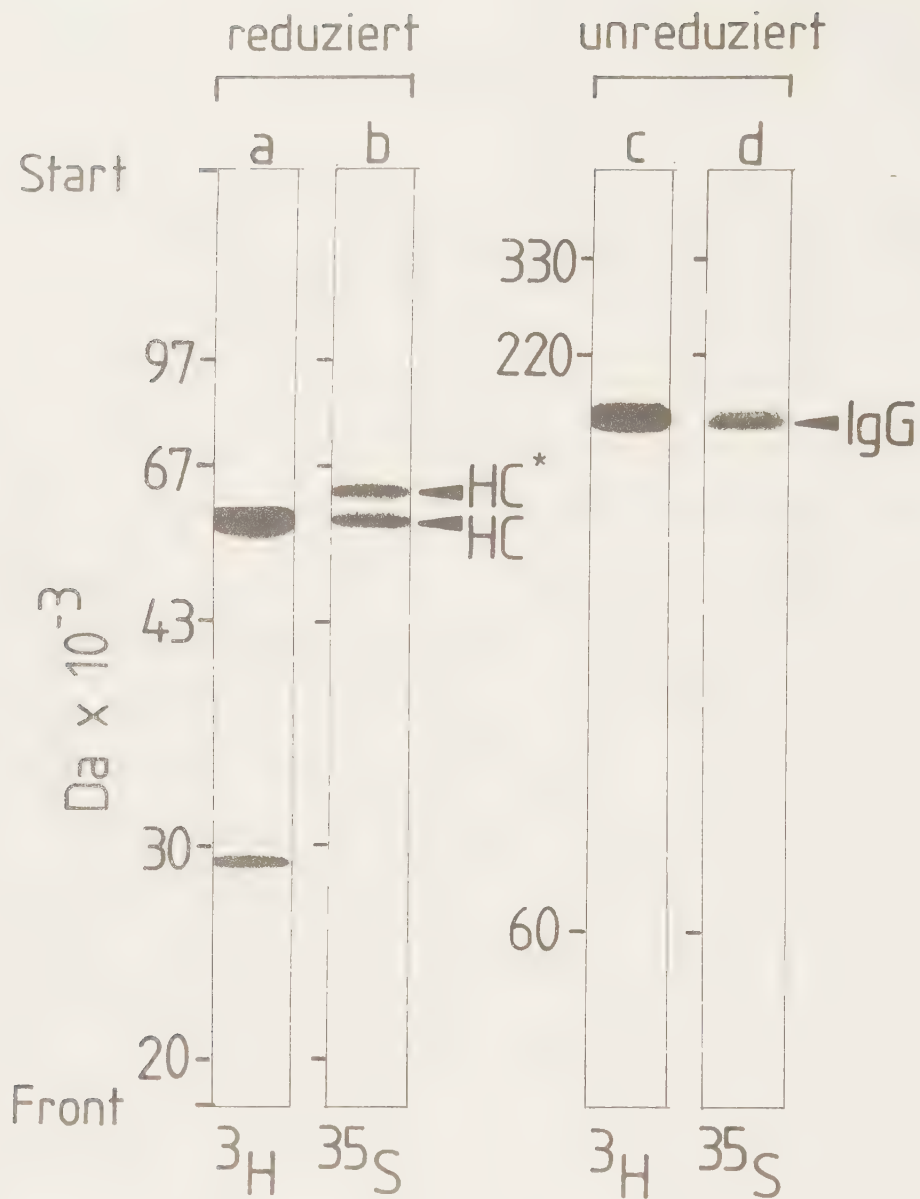


Abb.4.1.: Sulfatierung der Schweren Kette des IgG in M31 Hybridomazellen. Fluorogramme von 10% (Spuren a und b) und 6% (Spuren c und d) SDS-Gelen sind gezeigt. Mit [^3H]Tyrosin (Spuren a und c) und [^{35}S]Sulfat (Spuren b und d) markiertes IgG wurde aus dem Zellkulturmedium affinitätsgereinigt und in der Anwesenheit (reduziert) und Abwesenheit (unreduziert) von β -Mercaptoethanol elektrophoretisch getrennt. Pfeile geben die Positionen der Schweren Kette mit 55 kDa (HC), einer Variante der Schweren Kette mit 60 kDa (HC) und des IgG-Tetramers (IgG) an. Die Positionen von Molekulargewichtstandards sind an der linken Seite der Spuren angezeigt.

IgG-Tetramers (Abb.4.1., d). Diese Beobachtung legt nahe, daß die sulfatierte Bande mit 60 kDa eine seltene Variante der Schwere Kette des IgG war (vergleiche Koehler et al., 1978), die höher sulfatiert war, als die vorherrschende 55 kDa Form der Schwere Kette.

4.2. Die Schwere Kette des IgG2a ist auch nach Tunicamycinbehandlung der Zellkulturen sulfatiert.

Da bekannt ist, daß die Schwere Kette N-glykosyliert ist (siehe Clamp und Johnson, 1972), bestand die Möglichkeit, daß das Sulfat entweder an Kohlenhydratreste, Tyrosinreste oder an beide gebunden war. Um zwischen Kohlenhydratsulfatierung und Tyrosinsulfatierung zu unterscheiden, wurde markiertes IgG, das von Kontrollzellen sekretiert wurde, mit dem verglichen, das von mit Tunicamycin behandelten Zellen sekretiert wurde. Tunicamycin ist ein Inhibitor der N-Glykosylierung (siehe Schwarz und Datema, 1982; Elbein, 1981) und verhindert daher gleichzeitig das Auftreten von Sulfat an N-gebundenen Kohlenhydratresten. Die Schwere Kette des IgG, die in der Anwesenheit von Tunicamycin produziert und sekretiert wurde, lief nach SDS-PAGE schneller als die von Kontroll-IgG und hatte eine apparente Molmasse von 51 kDa (Abb.4.2., b). Diese Schwere Kette mit 51 kDa enthielt keine signifikanten Mengen an (^3H)Galaktose (Abb.4.2., d, Tab.4.1.), (^3H)Fukose (Tab.4.1.) oder (^3H)Mannose (Tab.4.1.), aber war stark mit

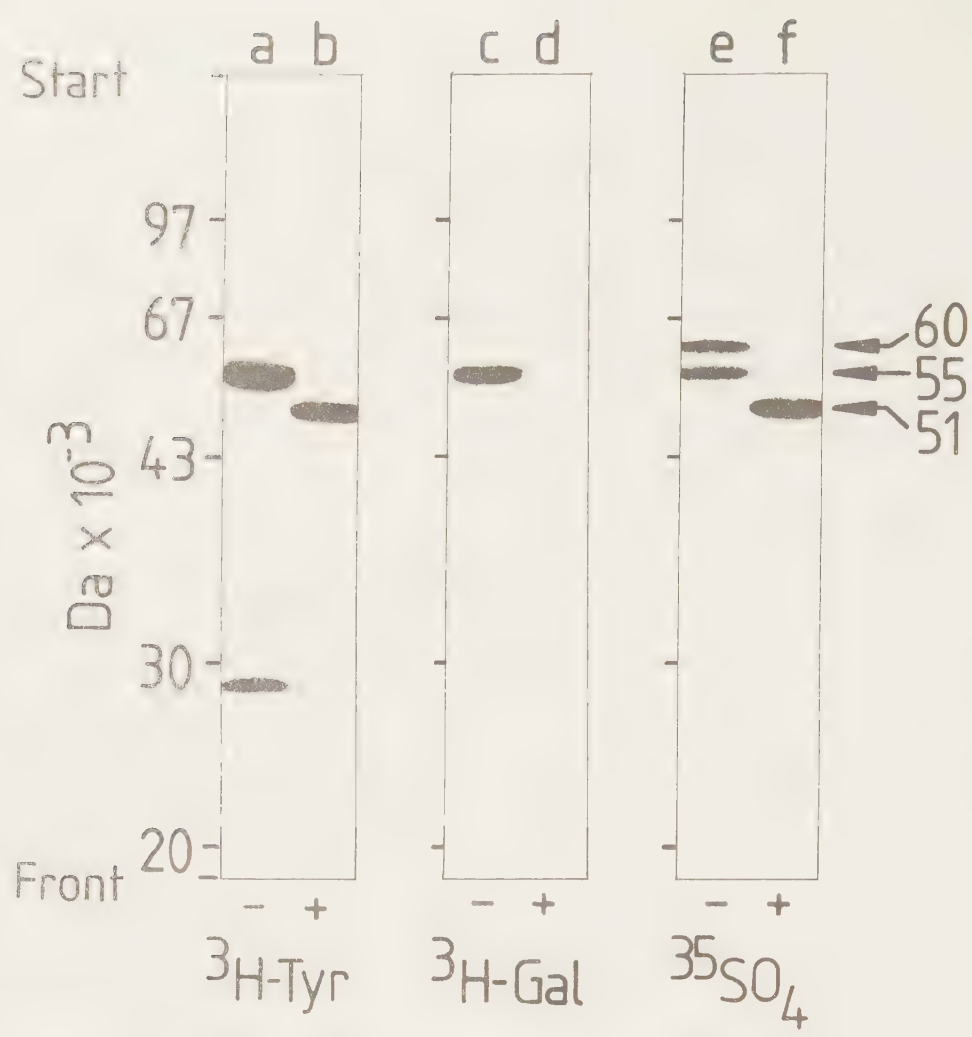


Abb.4.2.: Sulfatierung der Schweren Kette des IgG in der An- und Abwesenheit von Tunicamycin. Fluorogramme von reduzierenden 10% SDS-Gelen sind abgebildet. IgG wurde in der An- (+) und Abwesenheit (-) von Tunicamycin mit [³H]Tyrosin (Spuren a und b), [³H]Galaktose und [³⁵S]Sulfat markiert und aus den Zellkulturüberständen affinitätsgereinigt. Pfeile geben die Positionen der glykosylierten Formen der Schweren Kette mit 55 und 60 kDa und einer nicht glykosylierten Form mit 51 kDa an. Die Positionen von Molekulargewichtstandards sind an der linken Seite der Spuren angezeigt.

	³ H-Tyrosin	³ H-Fukose	³ H-Galaktose	³ H-Mannose	³⁵ S-Sulfat (gesamt)	Tyrosin ³⁵ S-Sulfat
Kontrolle (55 kDa HC)	549 525	6212	5333	1016	3216 (100 %)	23 (0,7 %)
cpm						
Tunicamycin (51 kDa HC)	287 680	19	19	20	6439 (100 %)	4035 (63 %)
cpm						

Tab.4.1.: Der Effekt von Tunicamycin auf die Glykosylierung und Sulfatierung der Schweren Kette des IgM. Radioaktiv markierte Schwere Ketten des IgG wurden durch Verdau mit Pronase aus SDS-Gelen eluiert und die Radioaktivität in den Eluaten bestimmt. Von den Eluaten der [³⁵S]Sulfat markierten Schweren Kette wurde nur ein Aliquot zum Zählen verwendet und die Radioaktivität für das ganze Eluat extrapoliert. Mit dem Rest des Eluates wurde eine Tyrosinsulfatanalyse durchgeführt und die Radioaktivität im Tyrosinsulfatfleck nach zweidimensionaler Dünnschichtelektrophorese bestimmt. Die Zahlen in Klammern geben die Prozentzahl des gesamten Sulfates (100%) an, die als Tyrosinsulfat auffindbar war.

(³⁵S)Sulfat markiert (Abb.4.2., f; Tab.4.1.). Das IgG mit der Schwere Kette von 51 kDa konnte immer noch das Antigen binden (nicht abgebildet).

4.3. Unter Kontrollbedingungen ist die Schwere Kette an Kohlenhydratresten sulfatiert, unter Tunicamycinbedingungen an Tyrosinresten.

Die sulfatierten 55 kDa- und 60 kDa-Formen der Schwere Kette von Kontroll-IgG, sowie die 51 kDa-Form der Schwere Kette von IgG nach Tunicamycinbehandlung wurden einer alkalischen Hydrolyse mit Bariumhydroxid unterzogen. Bei dieser Behandlung wird Tyrosinsulfat intakt aus Proteinen freigesetzt, während Sulfat, das an Kohlenhydratresten gebunden ist, hydrolysiert wird und als Bariumsulfat nach Neutralisierung der Hydrolysate ausfällt (Huttner, 1984). Die Anwesenheit von Tyrosinsulfat wurde durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese und anschließende Autoradiographie untersucht. Weniger als 1% des radioaktiven Sulfates, das in der 55 kDa- oder 60 kDa-Form der Schwere Kette des IgG eingebaut war, war als Tyrosinsulfat vorhanden (Abb.4.3., a; Tab.4.1.). Der größte Teil des Sulfats präzipitierte während der alkalischen Hydrolyse als Bariumsulfat, was eine alkali-labile Bindung des Sulfats an Kohlenhydratreste nahe legt. Eine Analyse von pronaseverdaulichem Material (Abb.4.3., b) zeigte, daß die alkali-labilen Sulfatreste nicht an Serin- oder

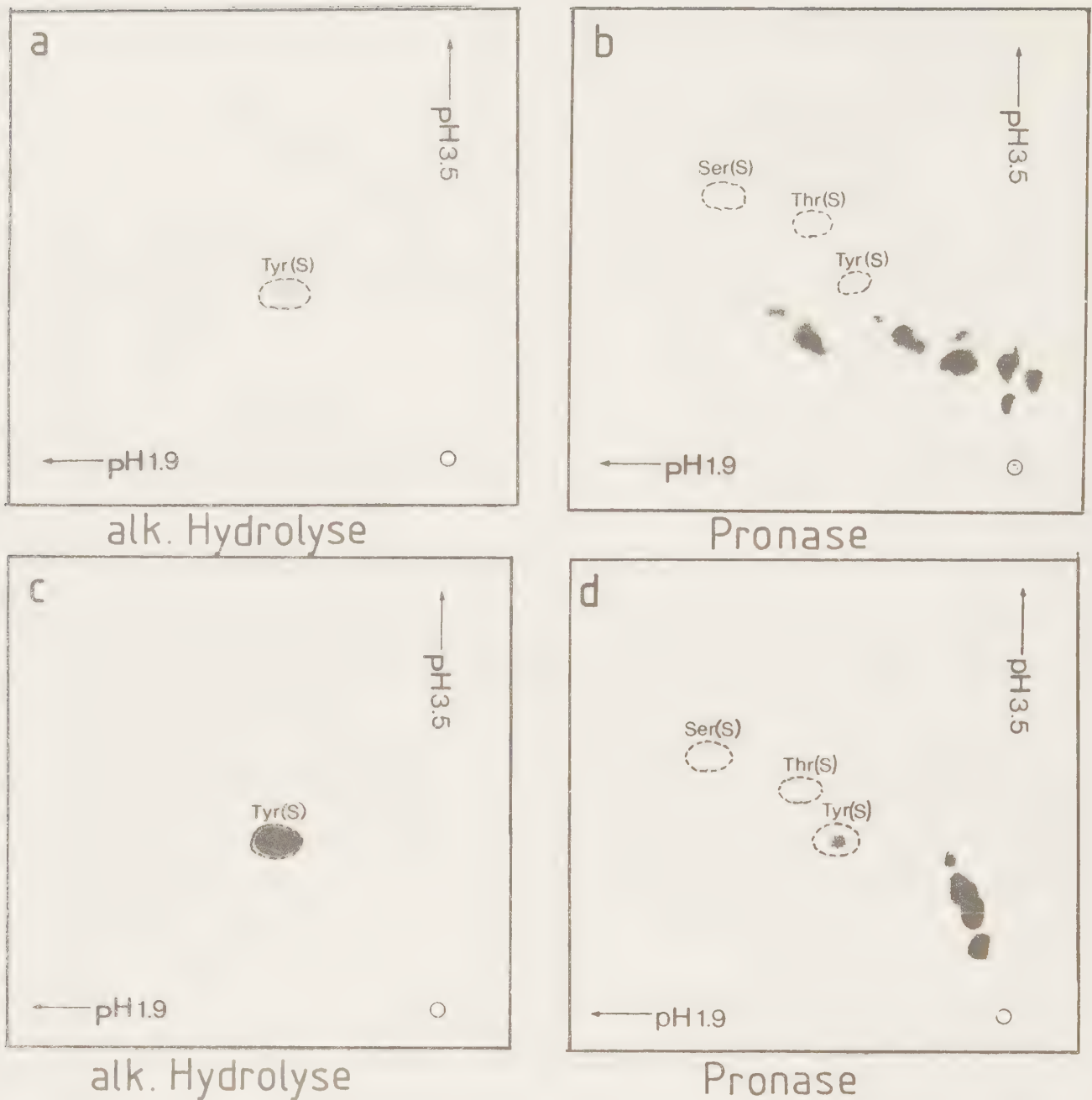


Abb.4.3.: Die Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin resultiert in der Tyrosinsulfatierung der Schweren Kette des IgG. Autoradiogramme von Dünnschichtcelluloseplatten sind gezeigt. Alkalische Hydrolysate (a und c) und mit Pronase verdaute Proben (b und d) der [^{35}S]Sulfat markierten 55 kDa-Form der Schweren Kette des IgG aus Kontrollkulturen (a und b) und der markierten 51 kDa-Form der Schweren Kette aus mit Tunicamycin behandelten Kulturen (c und d) wurde durch zweidimensionale Dünnschichtelektrophorese analysiert. Der Kreis in der rechten unteren Ecke zeigt den Auftraugsort. Die gestrichelten Linien zeigen die Positionen von ninhydringefärbtem Serinsulfat- (Ser(S)), Threoninsulfat- (Thr(S)) und Tyrosinsulfatsatndard (Tyr(S)).

Threoninresten gebunden waren. Im Gegensatz dazu waren nach alkalischer Hydrolyse der 51 kDa-Form der Schweren Kette mehr als 60% des eingebauten radioaktiven Sulfats als Tyrosinsulfat nachweisbar (Abb.4.3., c; Tab.4.1.). Pronaseverdau der 51 kDa-Form setzte nur Tyrosinsulfat und kein Serin- oder Threoninsulfat frei (Abb.4.3., d). Das Sulfat, das nicht als Tyrosinsulfat nachweisbar war (weniger als 40%), könnte entweder alkali-labil in O-gebundenen Kohlenhydratresten vorgelegen haben (nicht an Galaktose, Fukose oder Mannose, siehe Tab.4.1.) oder ging von Tyrosinresten während des Hydrolyseverfahrens verloren. Keine ^{35}S -Markierung war in den Positionen von Methionin, Cystein oder Cysteinsäure nachweisbar, wenn Hydrolysate der Schweren Ketten durch eindimensionale Dünnschichtelektrophorese und Autoradiographie untersucht wurden (siehe Huttner, 1984).

4.4. Die Kohlenhydratsulfatierung des IgG2a ist im F_{ab} -Teil der Schweren Kette lokalisiert, die Tyrosinsulfatierung im F_{c} -Teil.

Von Kontroll- und tunicamycinbehandelten Zellen sekretiertes IgG2a wurde mit Papain (Putnam et al., 1962) verdaut und die resultierenden F_{c} - und F_{ab} -Fragmente durch Protein A-Sepharose Affinitätschromatographie getrennt (Abb.4.4.). Sowohl die F_{c} -Fragmente (Abb.4.4., a), als auch die F_{ab} -Fragmente (Abb.4.4., e) der Schweren Kette des

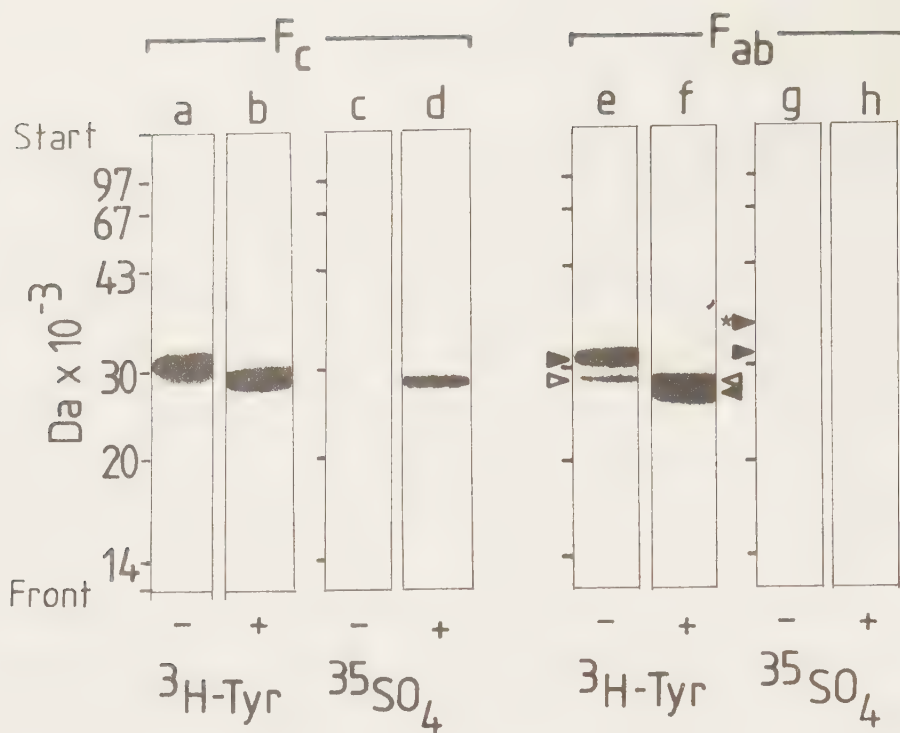


Abb.4.4.: Die glykosylierte Schwere Kette des IgG ist im F_{ab} -Fragment sulfatiert, wogegen die unglykosylierte Form der Schwere Kette im F_c -Fragment tyrosinsulfatiert ist.

Fluorogramme von reduzierenden 13% SDS-Gelen sind abgebildet. IgG wurde in der An- (+) und Abwesenheit (-) von Tunicamycin mit [^3H]Tyrosin (Spuren a,b,e und f) und [^{35}S]Sulfat (Spuren c,d,g, und h) markiert, dann affinitätsgetrennt und mit Papain verdaut. Die resultierenden F_c -Fragmente (Spuren a-d) wurden von den F_{ab} -Fragmenten (Spuren e-h) durch Chromatographie an Protein A-Sepharose getrennt. Die nicht ausgefüllten Pfeile zeigen die Position der Leichten Kette (Spuren e und f) und die ausgefüllten Pfeile die Positionen der F_{ab} -Fragmente. Die Positionen von Molekulargewichtstandards sind jeweils an der linken Seite der Spuren angezeigt.

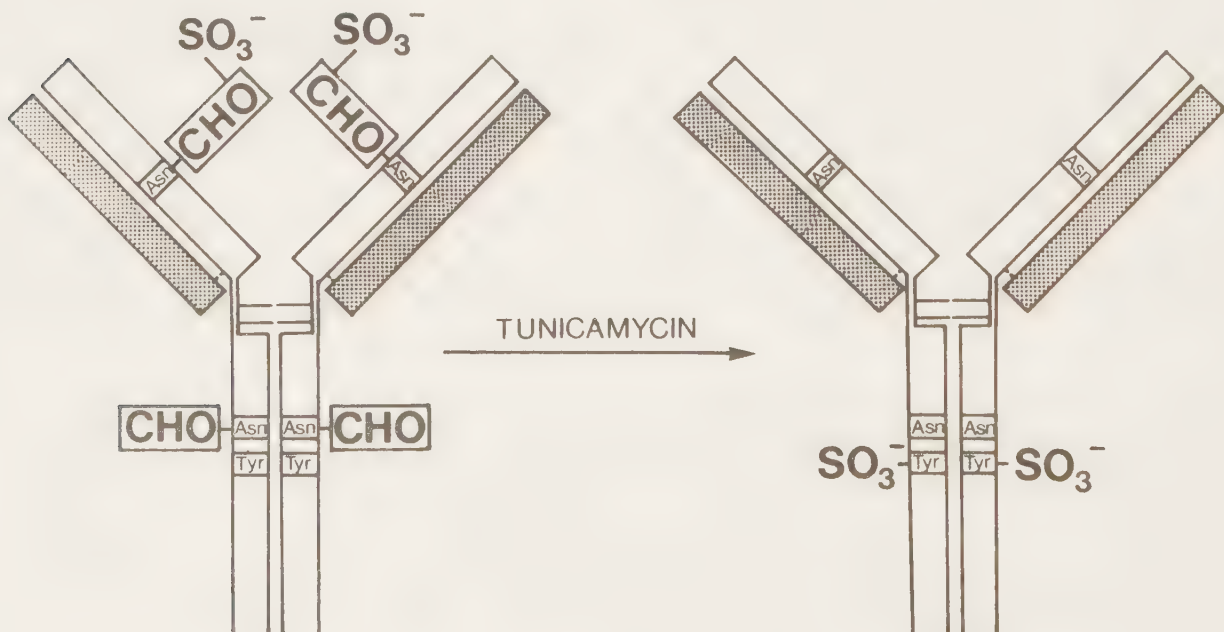


Abb.4.5.: Ein Modell, das den Effekt von Tunicamycin auf die Glykosylierung und Sulfatierung des IgG2a von M31 Hybridomazellen veranschaulicht.

Das IgG-Modell links zeigt die bekannten N-gebundenen Oligosaccharide (Asn-CHO) in der F_c -Domäne und die vermuteten N-gebundenen sulfatierten Oligosaccharide (Asn-CHO- $^{35}SO_4^-$) in der F_{ab} -Domäne. Nach Hemmung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin wird ein Tyrosinrest in der F_c -Domäne (substöchiometrisch) sulfatiert, wie in dem IgG-Modell rechts gezeigt ist.

Kontroll-IgGs bewegten sich langsamer in SDS-Polyacrylamidgelen als die entsprechenden Fragmente der Schwere Kette von IgG, das von tunicamycinbehandelten Zellkulturen stammt (Abb.4.4., b und f). Beide Fragmente der Schwere Kette inkorporierten (^3H)Galaktose, (^3H)Fukose und (^3H)Mannose, wobei das Verhältnis von Galaktose zu Fukose im F_{ab} -Fragment höher war als im F_c -Fragment (nicht abgebildet). Diese Beobachtungen zeigen, daß sowohl die F_{ab} - als auch die F_c - Fragmente der Schwere Kette mindestens 1 N-gebundenes Oligosaccharid enthielten (vgl. Sox et al., 1970). Das Sulfat im Kontroll-IgG war offensichtlich an Oligosaccharidresten in der F_{ab} -Domäne gebunden (Abb.4.4., g) und nicht an solchen in der F_c -Domäne (Abb.4.4., c). Im Gegensatz dazu waren die Tyrosinsulfatreste, die nach Tunicamycinbehandlung zu beobachten waren in der F_c -Domäne der Schwere Kette lokalisiert (Abb.4.4., d).

Die vorliegenden Befunde sind zu einem Modell in Abb.4.5. zusammengefasst.

4.5. Die Tyrosinsulfatierung von IgG2a nach Tunicamycinbehandlung ist substöchiometrisch.

IgG von Kontroll- und Tunicamycin behandelten Zellen wurde unter reduzierenden Bedingungen durch isoelektrische Fokussierung und darauffolgender SDS-PAGE untersucht (Abb.4.6.). Mehrere Isoformen der 55 kDa-Form der Schwere

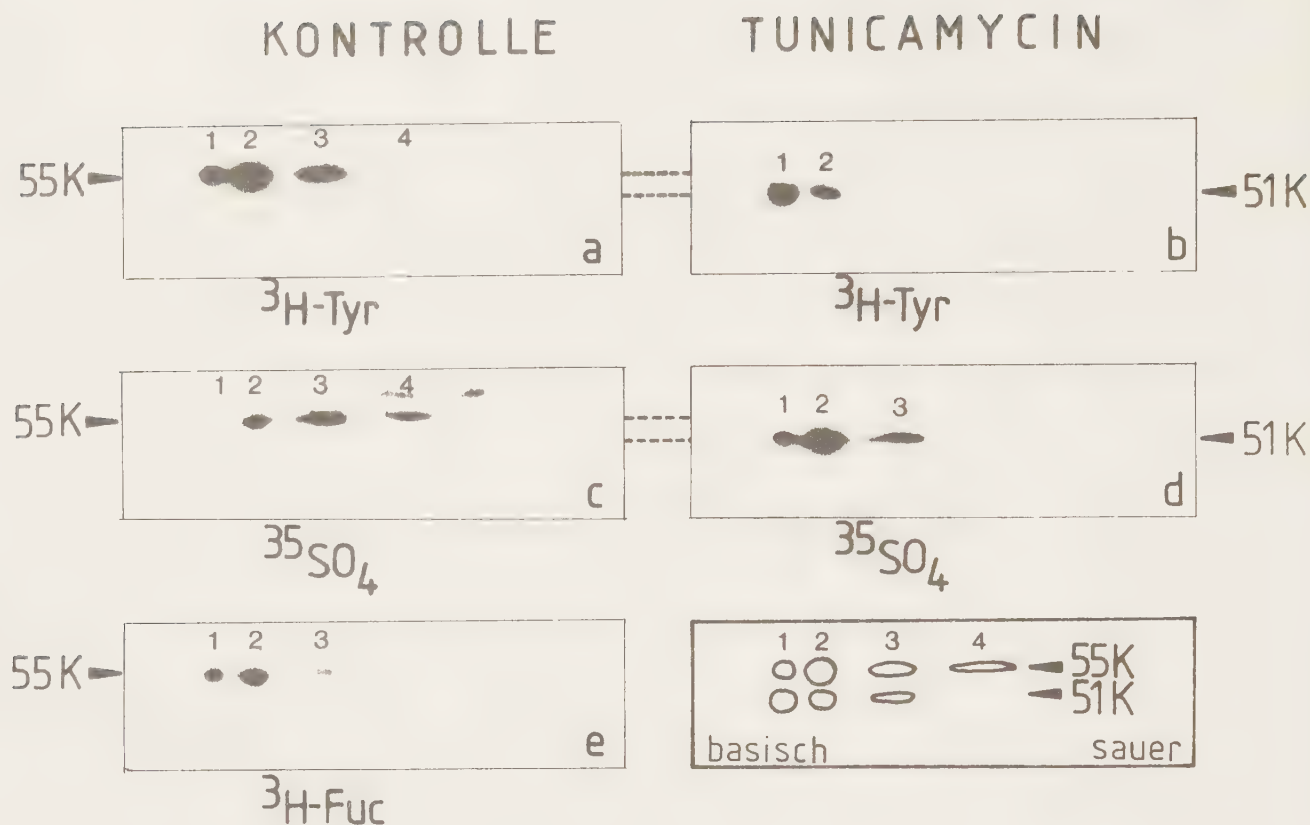


Abb.4.6.: Analyse der isoelektrischen Varianten der Schweren Kette des IgG von Kontroll- und mit Tunicamycin behandelten Zellkulturen. Ausschnitte aus Fluorogrammen von zweidimensionalen Gelen sind gezeigt. Affinitätsgeinigte, [³H]Tyrosin (a und b), [³⁵S]Sulfat (c und d) und [³H]Fukose (e) markierte Schwere Kette des IgG wurde in der ersten Dimension isoelektrofokussiert und in der zweiten Dimension auf reduzierenden 10% SDS-Gelen getrennt. Die Positionen der glykosylierten 55 kDa-Form und der nicht-glykosylierten 51 kDa-Form sind durch Pfeile und gestrichelte Linien angezeigt. Varianten mit ähnlichem isoelektrischem Punkt tragen gleiche Nummern. Der linke Rand der Abbildungen entspricht einem isoelektrischen Punkt von 7,2 und der rechte einem von 6,2.

Kette waren nachweisbar (vgl. Koehler et al., 1978) und ihre Verhältnisse nach (^3H)Tyrosin- (Abb.4.6., a) und (^3H)Fukosemarkierung (Abb.4.6., e) sowie nach Färbung mit Coomassieblau (nicht abgebildet) waren sehr ähnlich. Alle Isoformen enthielten radioaktives Sulfat (Abb.4.6., c). Die Verhältnisse von (^{35}S)Sulfat zu (^3H)Tyrosin in den Isoformen waren verschieden, wobei die höher sulfatierten Formen azider waren. Ähnliche Beobachtungen wurden mit den Isoformen der nicht-glykosylierten 51 kDa- Form der Schweren Kette gemacht, die auch alle sulfatiert waren (Abb.4.6., b und d).

Diese Befunde legen nahe, daß sowohl die an Kohlenhydratresten sulfatierte 55 kDa- Form, als auch die tyrosinsulfatierte 51 kDa-Form stöchiometrisch sulfatiert vorlagen, da keine unsulfatierten isoelektrischen Varianten nachweisbar waren. Um diesen Befund abzusichern, wurde eine Tyrosinsulfatstöchiometrieanalyse (siehe Kapitel 5) mit (^{14}C)Tyrosin-markierter 51 kDa-Form der Schweren Kette durchgeführt. Dies ergab, daß weniger als 1% der Tyrosinreste in der Schweren Kette sulfatiert waren, was für eine stöchiometrische Sulfatierung der Schweren Kette nicht ausreichend ist.

DISKUSSION

Der in diesem Kapitel beschriebene Effekt der N-Glykosylierung auf die Tyrosinsulfatierung von IgG2a, als auch der in Kapitel 2 beschriebene Effekt der Sialylierung auf die Tyrosinsulfatierung von IgM zeigen, daß die Tyrosinsulfatierung von Proteinen durch die Anwesenheit anderer kovalenter Proteinmodifikationen beeinflußt werden kann.

Bei der Untersuchung der Schweren Kette des IgM (Kapitel 2) wurde gefunden, daß die azideren isoelektrischen Varianten, die durch einen höheren Anteil von Sialinsäure hervorgerufen wurden, besser in vivo sulfatiert wurden. Es ist denkbar, daß die Sulfotransferase azidere Substrate bevorzugt. Wie die vergleichende Untersuchung bekannter Tyrosinsulfatierungsstellen in Kapitel 3 zeigte, kommen Aminosäuren mit Carboxylseitengruppen in der Nachbarschaft sulfatierbarer Tyrosinreste sehr häufig vor. Vielleicht kann Sialinsäure, die auch eine Carboxylfunktion besitzt, bei der Bildung einer Tyrosinsulfatierungsstelle selbst mitwirken. Die reduzierte Tyrosinsulfatierung der Schweren Kette des IgM nach Inhibierung der N-Glykosylierung durch Tunicamycin, könnte demnach durch die Abwesenheit bestimmter Sialinsäurereste bedingt gewesen sein.

IgG2a, das substöchiometrisch an Kohlenhydratresten sulfatiert war, wurde nach Hemmung der N-Glykosylierung

durch Tunicamycin de novo im F_C -Teil der Schweren Kette an Tyrosin (substöchiometrisch) sulfatiert. Mit großer Wahrscheinlichkeit blockierte der Oligosaccharidrest im F_C -Teil der Schweren Kette die einzige potentielle Tyrosinsulfatierungsstelle in Position 179 (siehe Abb.3.5.). Nach Gabe des N-Glykosylierungshemmers Tunicamycin wurde der Tyrosinrest für die Tyrosylprotein Sulfotransferase zugänglich. Da die Sequenz um das Tyrosin 179 die Konsensusstruktur nur partiell erfüllte, hat nur eine teilweise Sulfatierung stattgefunden.

Die Befunde mit den Immunoglobulinen G2a und M haben die Hypothese bestätigt, daß die Tyrosinsulfatierung von Proteinen im trans Golgi Apparat tatsächlich von anderen Proteinmodifikationen, die vorher oder gleichzeitig stattfinden, beeinflußt werden kann.

Z W E I T E R T E I L

A n s ä t z e d i e F u n k t i o n e n d e r T y r o s i n s u l f a t i e r u n g z u u n t e r s u c h e n

Ein gentechnologischer Ansatz:

- (5) Suche nach einem Modellprotein für eine gerichtete Mutagenese und dessen Charakterisierung
- (6) Die Bestimmung der Sequenzposition des sulfatierten Tyrosinrestes

Ein pharmakologischer Ansatz:

- (7) Suche nach einem wirkungsvollen Inhibitor der Tyrosinsulfatierung

K A P I T E L 5

DIE DOTTERPROTEINE VON DROSOPHILA MELANOGASTER ALS
MODELLPROTEINE ZUM STUDIUM DER
TYROSINSULFATIERUNG VON PROTEINEN

EINFÜHRUNG

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Tyrosinsulfatierung eines sekretorischen Proteins im trans Golgi Netzwerk stattfindet, stellt sich nun die Frage welche Rolle die Tyrosinsulfatierung in dem Golgi Kompartiment spielt, dessen Funktion es ist, Proteine terminal zu modifizieren und lysosomale, Plasmamembran- und sekretorische Proteine voneinander auszusortieren.

Grundsätzlich bestehen die folgenden zwei Möglichkeiten :

(1) Die Tyrosinsulfatierung dient - neben anderen Modifikationen - dazu, sekretorischen Proteinen ihren endgültigen Phänotyp zu verleihen. Die Modifikation rüstet so Proteine für ihre endgültige Umgebung aus, zu der sie nach der Sekretion aus der Zelle gelangen. Außerhalb der Zelle könnten sulfatierte Tyrosinreste an der Wechselwirkung des sulfatierten Proteins mit anderen Proteinen beteiligt sein. Die Modifikation könnte z.B. für die Stabilität oder

Instabilität des Proteins gegenüber Proteasen verantwortlich sein oder bei der Wechselwirkung mit Rezeptoren eine Rolle spielen (siehe Cholecystokinin, Einleitung). Die Tyrosinsulfatierung würde somit sehr spezielle Funktionen in einzelnen Proteinen erfüllen.

(2) Die Tyrosinsulfatierung könnte intrazellulär bereits für tyrosinsulfatierte Proteine von Bedeutung sein. So ist es z.B. denkbar, daß diese Proteinmodifikation für die Aussortierungsfunktion des trans Golgi eine Rolle spielt, die es erforderlich machen würde, daß die Tyrosylproteinsulfotransferase spezifisch im trans Golgi Netzwerk lokalisiert sein muß. Damit hätte die Tyrosinsulfatierung in den modifizierten Proteinen eine sehr generelle Funktion. Überdies könnte die Modifizierung nach dem die modifizierten Proteine sekretiert wurden, noch spezielle Aufgaben erfüllen.

Um diese Möglichkeiten zu testen, wurde ein Modellsystem gesucht. Der methodische Ansatz war, ein Protein ausfindig zu machen, das stöchiometrisch an nur einem Tyrosinrest sulfatiert ist und das bereits möglichst gut auf DNA- und Proteinebene charakterisiert worden ist. Dieses Protein soll dann gentechnisch so verändert werden, daß es in vivo nicht mehr sulfatiert werden kann. Das mutierte Protein kann dann in einer Zelllinie exprimiert werden, die das Protein nicht besitzt, und im Vergleich zu dem gleichfalls exprimierten, sulfatierten Wildtyp-Protein untersucht

werden.

Wie bereits im ersten Kapitel kurz beschrieben ist, wurden in *Drosophila melanogaster* tyrosinsulfatierte Proteine gefunden, die nur in weiblichen Fliegen vorkommen. In diesem Kapitel werden diese Proteine als Dotterproteine 1, 2 und 3 identifiziert. Zwei Umstände könnten diese Proteine zu idealen Modellproteinen für den oben beschriebenen Ansatz machen. Erstens sind die Gene der drei Proteine bereits kloniert (Hovemann et al., 1981; Hung und Wensink, 1981; Hovemann und Galler, 1982; Hung und Wensink, 1983) und die Proteinsequenzen aus der DNA-Sequenz für Dotterprotein 1 und 2 abgeleitet worden. Zweitens sind die Dotterproteine von *Drosophila melanogaster* gut charakterisierte Proteine (siehe Mahowald und Kambyzellis, 1981; Hung und Wensink, 1983; Warren und Mahowald, 1979; Mintzas und Kambyzellis, 1982). Es muß daher nun abgeklärt werden, ob diese Proteine stöchiometrisch sulfatiert sind und ob vielleicht eines der Proteine nur eine Tyrosinsulfatierungsstelle besitzt, was eine gerichtete Mutagenese sehr erleichtern würde.

Die Dotterproteine werden in den Fettkörper- und Follikelzellen (Brennan et al., 1982) weiblicher, erwachsener Fliegen unter der Kontrolle von Stereoidhormonen synthetisiert (Handler und Postlethwait, 1978) und konstitutiv in die Hämolymphe sekretiert. Als Vitellogenine werden sie dann durch rezeptorvermittelte Endocytose in die Oozyten aufgenommen. Dort werden sie im Komplex mit Lipiden

in sogenannten Dotterkörperchen gespeichert. Im heranwachsenden Embryo werden die Dotterproteine proteolytisch abgebaut und ihre Aminosäuren für das Wachstum des Embryos verbraucht (siehe Mahowald und Kambyzellis, 1980). Wie aus dieser Beschreibung ersichtlich ist, gibt es in der Biogenese dieser Proteine mehrere Stationen in denen die Anwesenheit einer kovalenten Proteinmodifikation von Einfluß sein könnte. Diese Einflüsse können in *Drosophila melanogaster* direkt untersucht werden, indem das Gen eines mutierten Dotterproteins durch das P-Element in Fliegen exprimiert wird.

ZUSAMMENFASSUNG

Proteinsulfatierung wurde in Fliegen der Spezies *Drosophila melanogaster* nach in vivo-Markierung mit anorganischem (^{35}S)Sulfat untersucht. Nach Auftrennung der Fliegenproteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Proteine, die an Kohlenhydratresten und an Tyrosinresten sulfatiert waren, in allen untersuchten Molekulargewichtsregionen gefunden. Wenn männliche und weibliche Fliegen getrennt untersucht wurden, war zu beobachten, daß die elektrophoretischen Muster des proteingebundenen Kohlenhydratsulfats sehr ähnlich waren, wohingegen die elektrophoretischen Muster des proteingebundenen Tyrosinsulfats sehr unterschiedlich waren. Ein Hauptunterschied war das ausschließliche Vorkommen von drei tyrosinsulfatierten Proteinen mit apparenten Molmassen zwischen 48 und 45 kDa in weiblichen Fliegen. Nach zweidimensionaler Gelelektrophorese und anschließendem Proteintransfer auf Nitrocellulosefilter konnten diese Proteine durch Radioimmunomarkierung als die drei Dotterproteine von *Drosophila melanogaster* identifiziert werden. Alle drei Proteine wiesen mehrere isoelektrischen Varianten auf, die alle den gleichen Sulfatierungsgrad hatten. Alles Sulfat war an Tyrosinresten gebunden. Mit Hilfe der bekannten Anzahl der Tyrosinreste in den Dotterproteinen konnte die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung durch eine neue Methode bestimmt werden.

Dies ergab, daß Dotterprotein 1 ca 2,2 , Dotterprotein 2 ca 0,9 und Dotterprotein 3 ca 1,2 Mole Tyrosinsulfat pro Mol Protein enthielten. Diese Ergebnisse, zusammen mit der kürzlich berichteten Klonierung und Sequenzierung der Gene von Dotterprotein 1 und 2, könnten diese Proteine zu idealen Modellproteinen machen, mit denen die biologische Funktion der Tyrosinsulfatierung durch einen genetischen Ansatz studiert werden könnte.

ERGEBNISSE

5.1. *Drosophila* Fliegen haben tyrosinsulfatierte Polypeptide, die geschlechtsspezifisch vorkommen.

In vivo mit (^{35}S)Sulfat markierte Fliegen wurden nach Geschlechtern getrennt und in SDS homogenisiert. Die gesamten Proteine weiblicher und männlicher Fliegen wurden auf 10% SDS-Gelen aufgetrennt und neun verschiedene Molekulargewichtsregionen, wie in Abb.5.1. gezeigt, auf Proteinsulfatierung hin analysiert. Die gesamte ^{35}S -Radioaktivität, die durch Pronasebehandlung aus den Gelstücken freigesetzt werden konnte, ist in Abb.5.1. (A und B) in Form eines Histogramms aufgetragen. Die Pronaseeluate wurden einer alkalischen Hydrolyse mit Bariumhydroxid unterzogen und anschließend mit verdünnter Schwefelsäure neutralisiert. Unter diesen Bedingungen bleibt das alkali-stabile Tyrosinsulfat im Überstand. Das alkali-labile Sulfat, das an Kohlenhydraten gebunden war, wird hydrolysiert und quantitativ als Bariumsulfat präzipitiert (siehe Huttner, 1984). Die Überstände nach alkalischer Hydrolyse wurden eindimensional durch Dünnschichtelektrophorese analysiert. Die Radioaktivität, die in den einzelnen Molekulargewichtsbereichen als Tyrosin(^{35}S)sulfat auffindbar war, ist in Abb.5.1. (C und D) aufgetragen. Die Radioaktivität, die nicht als Tyrosin(^{35}S)sulfat auffindbar war und die nahezu vollständig

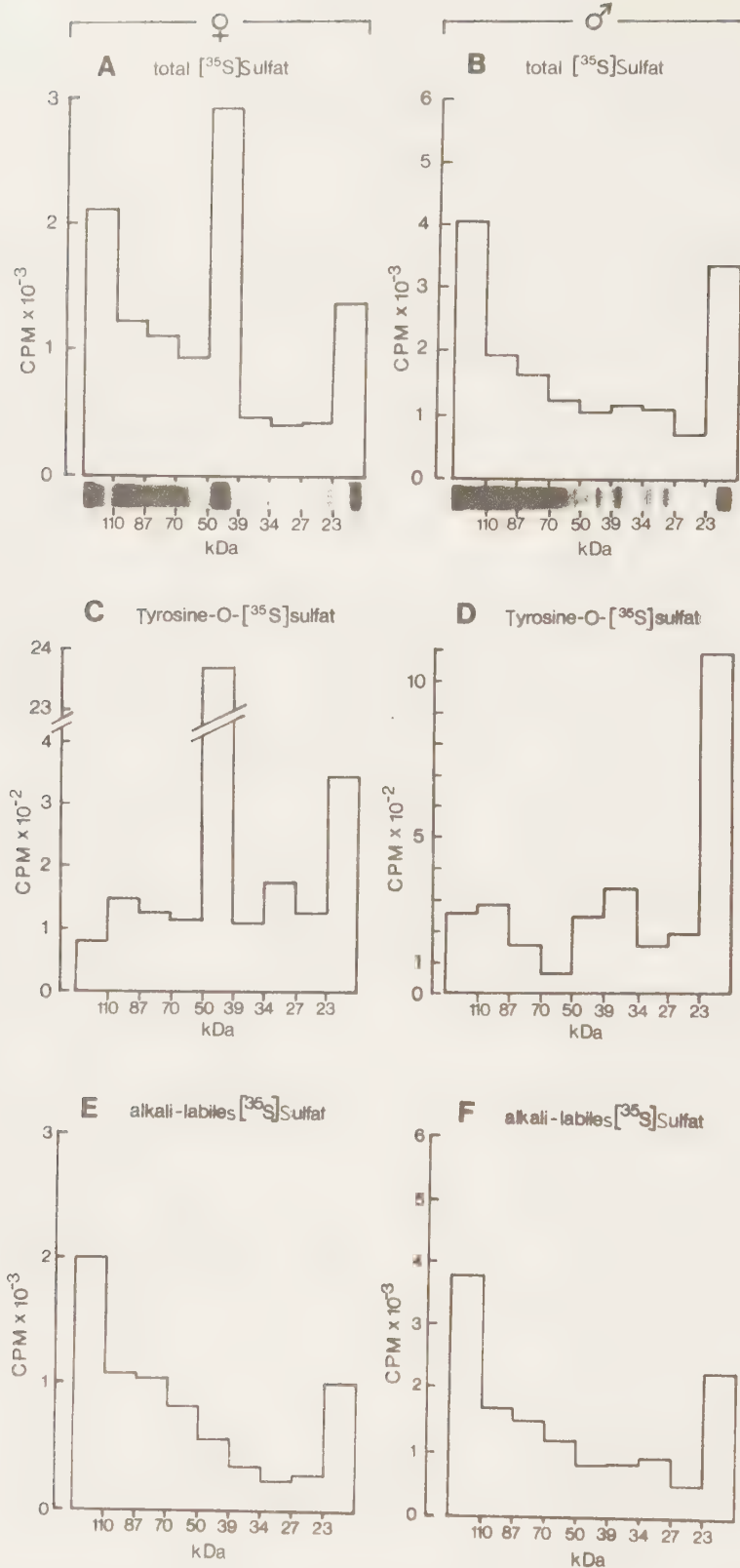


Abb.S.1.: Die haupttyrosinsulfatierten Proteine von *Drosophila melanogaster* sind spezifisch für weibliche Fliegen. Homogenate von mit [^{35}S]Sulfat markierten weiblichen und männlichen Fliegen wurden unter reduzierenden Bedingungen auf 10% SDS-Gelen analysiert (100 μg Protein/Gelspur) und anschließend fluorographiert. Die Fluorogramme sind unter den Abszissen von A und B gezeigt. Die Gele wurden in neun gleiche Teile geschnitten, deren Molekulargewichtsbereiche unter den Abszissen angegeben sind und die Radioaktivität aus den Gelstücken durch Behandlung mit Pronase eluiert. In einem Aliquot der Eluate wurde durch Szintillationszählung das gesamte in Proteine inkorporierte [^{35}S]Sulfat bestimmt. Die Werte in den Histogrammen A und B sind für eine einzelne Fliege berechnet. In dem Rest der Eluate wurde in Duplikaten der Anteil an proteingebundenem Tyrosinsulfat bestimmt. Die Mittelwerte der Duplikate wurden mit dem Wiederauffindungswert von Tyrosin- ^{35}S sulfatstandard (90.1% $\pm$ 1.6; Standardabweichung, $n=3$) korrigiert und sind in den Histogrammen C und D abgebildet. [^{35}S]Sulfat das nicht als Tyrosinsulfat auffindbar war, ist in den Histogrammen E und F gezeigt und dort als alkali-labiles Sulfat bezeichnet.

präzipitiert wurde, wurde als alkali-labiles Sulfat bezeichnet und ist in Abb.5.1. E und F aufgetragen.

Während die Verteilung alkali-labiler Proteinsulfatierung über die analysierten Molekulargewichtsbereiche in männlichen und weiblichen Fliegen sehr ähnlich war (Abb.5.1., E und F), war die Verteilung der Tyrosinsulfatierung geschlechtsspezifisch. Ein sehr auffälliger Unterschied zwischen weiblichen und männlichen Fliegen war das ausschließliche Vorkommen tyrosinsulfatierter Proteine mit apparenten Molmassen um 45 kDa in weiblichen Fliegen (Abb.5.1., C). Männliche Fliegen besaßen geschlechtsspezifische tyrosinsulfatierte Proteine mit apparenten Molmassen um 19 kDa (Abb.5.1., D; siehe auch Abb.1.8.).

5.2. Identifizierung der weibchenspezifischen, tyrosinsulfatierten Proteine als Dotterproteine 1, 2 und 3

Die tyrosinsulfatierten Proteine weiblicher Fliegen mit Molmassen um 45 kDa wurden durch zweidimensionale PAGE und Fluorographie näher untersucht (Abb.5.2., A und C). Die Proteine konnten in drei Gruppen mit apparenten Molmassen von 45000, 46000 und 48000 Da und mit isoelektrischen Punkten zwischen pH 6 und 7,5 aufgelöst werden. Die Proteine, die offenbar in isoelektrischen Varianten vorlagen, waren in männlichen Fliegen weder durch Fluorographie (Abb. D) noch durch Proteinfärbung (Abb. B)

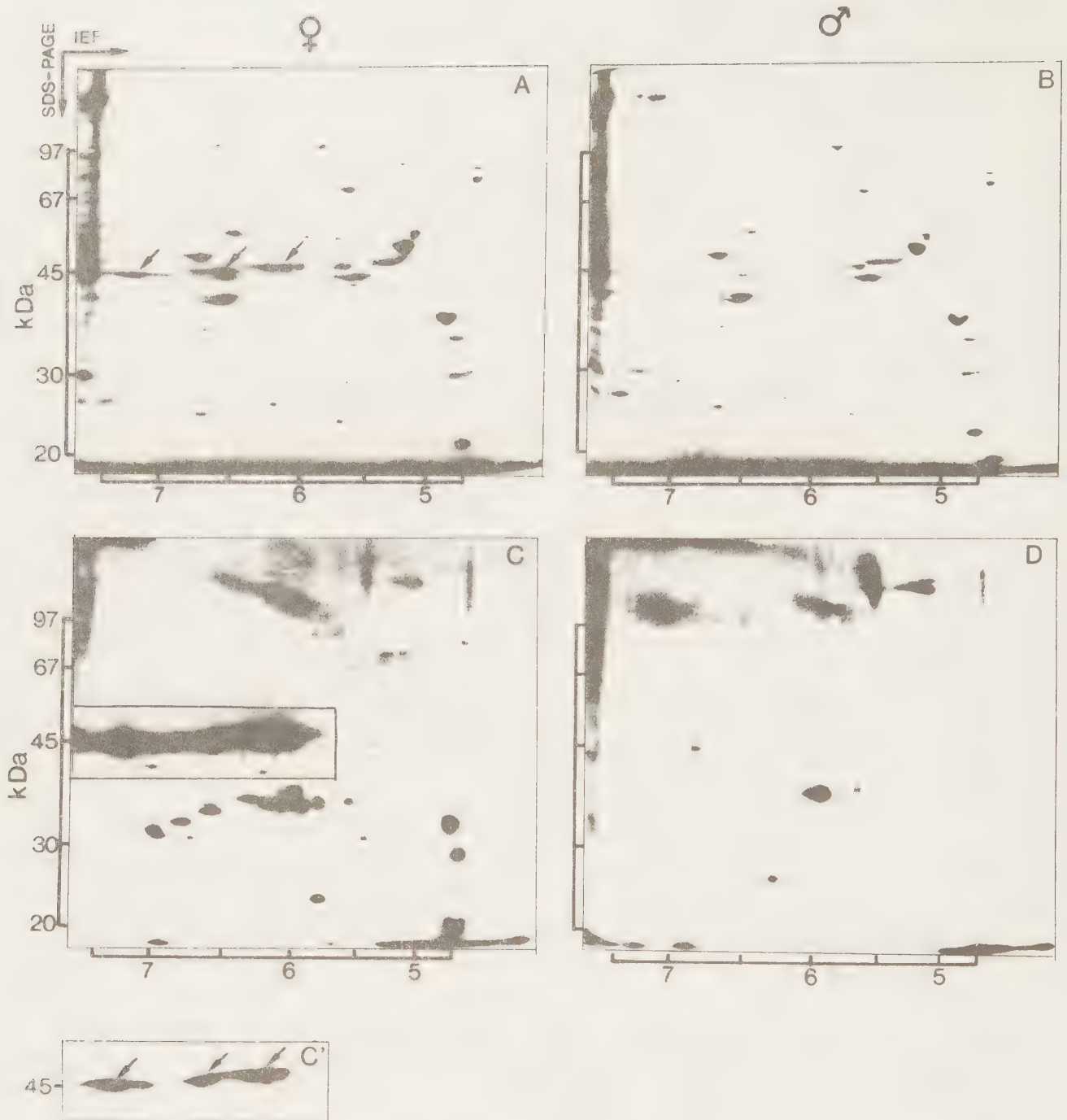


Abb.5.2.: Analyse der weibchen-spezifischen sulfatierten Proteine durch Zweidimensionale Gelelektrophorese. Homogenate von [^{35} S]Sulfat markierten weiblichen und männlichen Proteinen wurden in der ersten Dimension isoelektrofokussiert (IEF) und in der zweiten Dimension auf reduzierenden 10% SDS-Gelen (SDS-PAGE) getrennt, gefolgt von Proteinfärbung mit Coomassie Blau (A und B) und Fluorographie (C und D). Die Abbildung C' zeigt eine kürzer exponiertes Fluorogramm des in C eingefassten Ausschnitts. An der linken Seite der Abbildungen sind jeweils die Positionen von Molekulargewichtstandards und darunter die pH-Werte der Fokussierung angezeigt. Die drei Pfeile in A und C' geben die Positionen der drei hauptsulfatierten weibchen-spezifischen Proteine an.

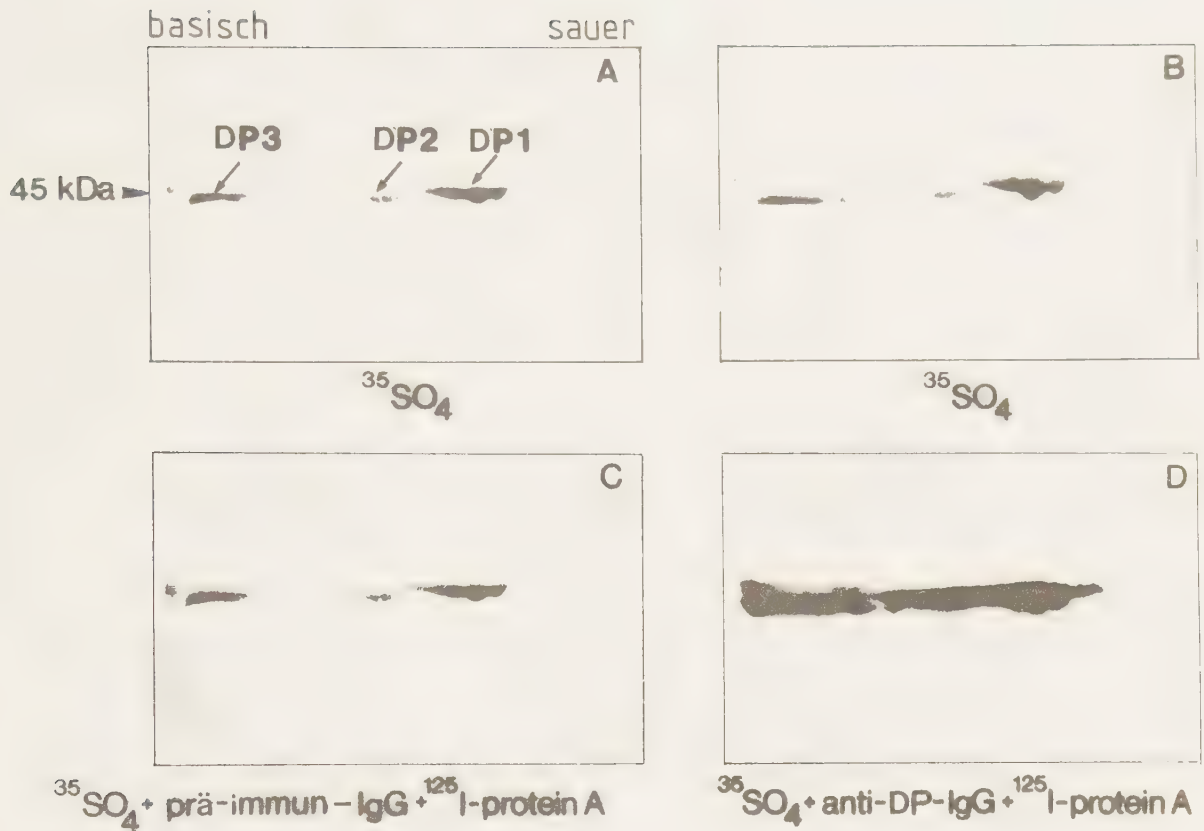


Abb.5.3.: Identifizierung der drei haupttyrosinsulfatierten Proteine weiblicher Fliegen als Dotterproteine 1, 2 und 3. Proteine von ^{35}S -Sulfat markierten Proteinen wurden in Duplikaten auf zweidimensionalen Gelen getrennt und die Proteine auf Nitrozellulosefilter übertragen. A und B zeigen Ausschnitte aus den Autoradiogrammen der zwei Filter (6 Stunden Exposition bei Raumtemperatur). Die Filter wurden dann entweder mit Präimmun-IgG (C) oder Anti-Dotterprotein-IgG (D) inkubiert, anschließend mit ^{125}I -Protein A markiert und dann auf Verstärkerfolie fluorographiert (1 Stunde Exposition bei -70°C , plus 5 Stunden bei Raumtemperatur) (C und D). Die Position eines 45 kDa Molekulargewichtstandards, sowie die Positionen der drei Dotterproteine sind in A angezeigt.

nachweisbar. Das ausschließliche Vorkommen der Proteine in weiblichen Fliegen, die apparenten Molmassen und die isoelektrischen Punkte (vergl. Warren und Mahowald, 1979, und Warren et al., 1979) legten nahe, daß diese drei Gruppen von Polypeptiden den Dotterproteinen 1, 2 und 3 von *Drosophila melanogaster* entsprachen. Um dies zu beweisen, wurde versucht die Proteine auf Nitrozellulosefiltern mit spezifischen Antikörpern zu markieren. Die gesamten (^{35}S)Sulfat-markierten Proteine weiblicher Fliegen wurden auf zweidimensionalen Gelen getrennt, auf Nitrozellulosefilter übertragen und die Filter fluorographiert (Abb.5.3., A und B). Nach Inkubation mit Kontroll-IgG oder Anti-Dotterprotein-IgG (erhalten von Dr. B. Hovemann, Heidelberg) kolokalisierte die Immunoreaktivität der spezifischen Antikörper, die durch Bindung von (^{125}I)Protein A sichtbar gemacht wurde, exakt mit der (^{35}S)Sulfatmarkierung der drei tryosinsulfatierten Proteine (Abb.5.3., D). Nach Reaktion der Filter mit einem Kontrollserum war nach Fluorographie keine Bindung von (^{125}I)Protein A nachweisbar (Abb.5.3., C).

5.3. Alle isoelektrischen Varianten der Dotterproteine sind sulfatiert.

Die Dotterproteine 1, 2 und 3 sind unterschiedlich stark sulfatiert.

Jedes der drei Dotterproteine existierte in mehreren

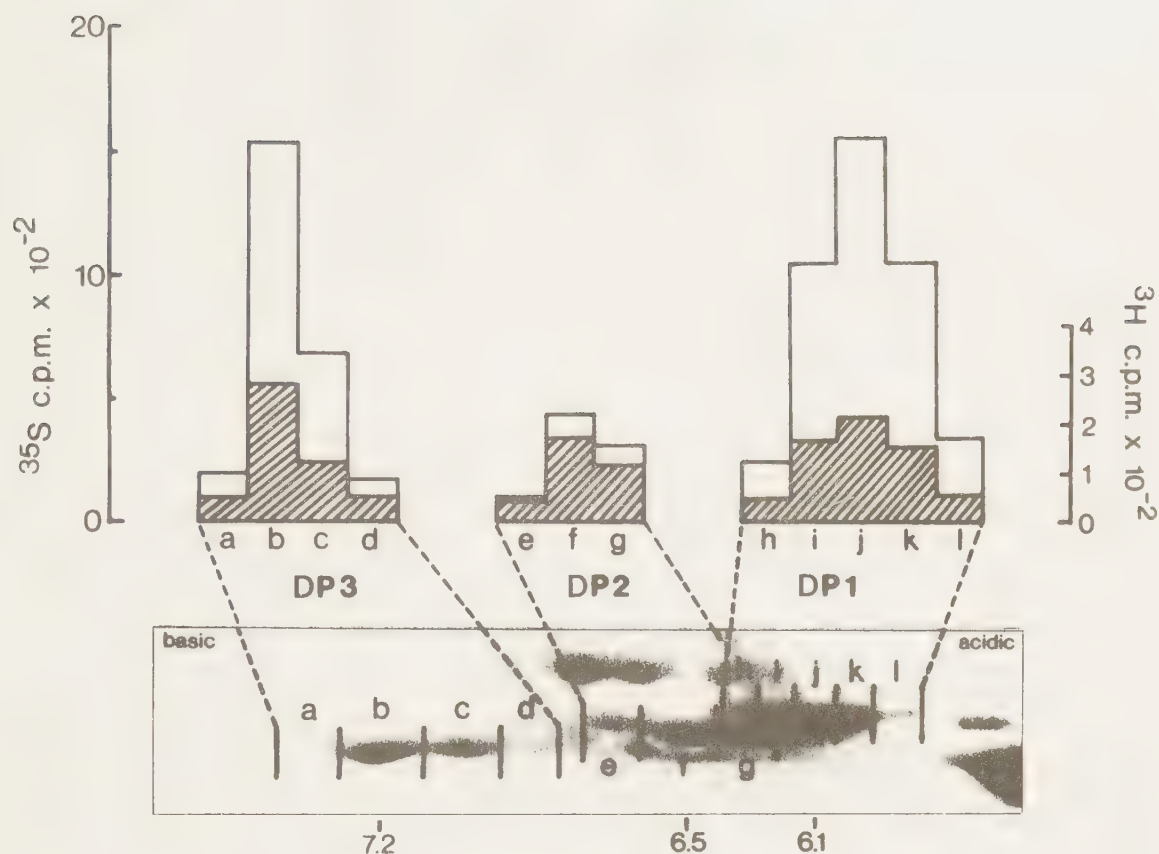


Abb.5.4.: Alle isoelektrischen Varianten der Dotterproteine sind sulfatiert. Homogenate weiblicher Fliegen, die mit [^3H]Tyrosin und [^{35}S]Sulfat doppelt markiert wurden, wurden durch zweidimensionale PAGE getrennt. Ein Ausschnitt des Coomassie Blau gefärbten Gels mit den Dotterproteinen (DP) 1, 2 und 3 und den pH-Werten der Hauptisoformen (unten) ist gezeigt. Die mit Buchstaben bezeichneten Varianten der Dotterproteine (DP1: h-l; DP2: e-g und DP3: a-d) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die ^3H - als auch die ^{35}S -Radiaktivität bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in einem Histogramm aufgetragen, wobei die Gesamtfläche die ^{35}S - (rechte Ordinate) und die schraffierte Fläche die ^3H -Radioaktivität (linke Ordinate) in den jeweiligen Isoformen wiedergeben.

isoelektrischen Formen (Abb.5.2., 5.3., 5.4.). Um zu untersuchen, ob die isoelektrischen Varianten die Folge unterschiedlicher Grade von Sulfatierung waren und ob die Dotterproteine unterschiedlich stark sulfatiert waren, wurden Fliegen in vivo für 30 Stunden mit (^3H)Tyrosin und (^{35}S)Sulfat doppel-markiert. Die isoelektrischen Varianten der Dotterproteine wurden nach zweidimensionaler PAGE ausgeschnitten und durch Flüssigkeitsszintillationszählung analysiert. Wie in Abb.5.4. durch Histogramme für die ^{35}S - und ^3H -Radioaktivität gezeigt ist, wiesen die isoelektrischen Varianten einzelner Dotterproteine keine signifikanten Unterschiede in ihren Sulfatierungsgraden auf, was darauf schließen lässt, daß die Varianten nicht durch unterschiedliche Sulfatierungsgrade verursacht wurden. Für keines der drei Dotterproteine wurden unsulfatierte Varianten gefunden. Das Verhältnis von ^{35}S - zu ^3H -Radioaktivität war in Dotterprotein 1 2,7 mal und in Dotterprotein 3 zweimal höher als in Dotterprotein 2 (vgl. Tab.5.2.).

5.4. Die Dotterproteine 1, 2 und 3 sind ausschließlich an Tyrosinresten sulfatiert.

In vivo mit (^{35}S)Sulfat-markierte Dotterproteine wurden durch zweidimensionale PAGE isoliert und einzeln durch alkalische Hydrolyse und eindimensionale Dünnschichtelektrophorese (Abb.5.5.) auf den Anteil von Tyrosin(^{35}S)sulfat am gesamten durch Pronase eluierbaren



Abb.5.5.: Tyrosinsulfatanalysen der Dotterproteine 1, 2 und 3. [³⁵S]Sulfat markierte Dotterproteine wurden aus Homogenaten markierter Fliegen durch zweidimensionale PAGE gereinigt und durch Pronasebehandlung aus dem Gel eluiert. In einem Aliquot der Eluate wurde die Radioaktivität bestimmt und daraus die gesamte Sulfatradioaktivität in den Eluaten berechnet. Der Rest der Eluate wurde alkalisch hydrolysiert und durch eindimensionale Dünnschichtelektrophorese bei pH 3,5 analysiert. Ein Autoradiogramm der Dünnschichtcelluloseplatte ist gezeigt. Die Radioaktivität im Tyrosinsulfatfleck wurde bestimmt und mit dem Wiederauffindungswert von radioaktivem Tyrosinsulfatstandard korrigiert (siehe Abb.5.1.). Die gestrichelte Linie gibt die Position von ninhydringefärbtem Tyrosinsulfat wieder.

	Gesamte ³⁵ S-Radioaktivität (cpm)	auffindbar als ³⁵ S-Tyrosinsulfat (cpm)	³⁵ S-Tyrosinsulfat gesamte ³⁵ S-Radioaktivität (Prozent)
Dotterprotein 1	31 050	27 689	89
Dotterprotein 2	5 892	5 180	88
Dotterprotein 3	11 169	10 746	92

Tab.5.1.: Die Dotterproteine sind nahezu ausschließlich an Tyrosinresten sulfatiert. Wie in Abb.5.5. beschrieben, wurde der Anteil des radioaktiven Tyrosinsulfates am gesamten Sulfat, das in die Dotterproteine in vivo inkorporiert wurde, berechnet.

(^{35}S)Sulfat analysiert. Wie in Tab.5.1. gezeigt ist, konnten für alle drei Dotterproteine 90% des eingebauten Sulfates als Tyrosinsulfat wiedergefunden werden, was ausschließt, daß die Dotterproteine signifikant an anderen Gruppen, z.B. an Kohlenhydratresten, sulfatiert waren.

5.5. Dotterproteine 1, 2 und 3 sind stöchiometrisch an Tyrosinresten sulfatiert.

In vivo mit (^{14}C)Tyrosin markierte Dotterproteine wurden durch zweidimensionale PAGE voneinander getrennt und nach Pronaseelution aus dem Gel alkalisch hydrolysiert. Freigesetztes (^{14}C)Tyrosin und (^{14}C)Tyrosinsulfat wurden voneinander und von anderen Aminosäuren durch ein zweidimensionales Dünnschichtelektrophorese/Chromatographiesystem getrennt (Abb.5.6., rechts). Wie für Dotterprotein 1 durch Autoradiographie der Cellulosedünnschichtplatte gezeigt ist (Abb.5.6., links), wurde ^{14}C -Markierung nur in den Positionen von Tyrosin und Tyrosinsulfat gefunden. Dies zeigt, daß während der in vivo-Markierung keine signifikante Inkorporation der ^{14}C -Markierung in andere Aminosäuren stattgefunden hat und daß die Freisetzung von Tyrosin und Tyrosinsulfat aus den Proteinen offenbar vollständig war. Bei jedem der drei Dotterproteine wurde die ^{14}C -Radioaktivität in den Positionen der Tyrosin- und Tyrosinsulfatstandards durch Flüssigkeitsszintillationszählung bestimmt (Tab.5.2., 1.

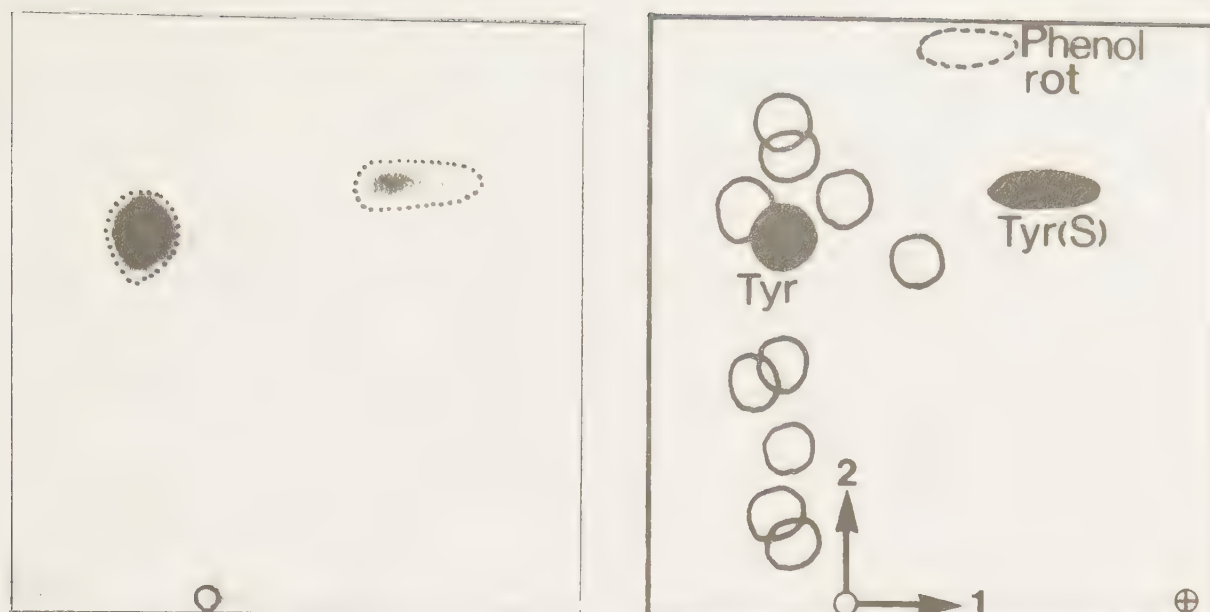


Abb.5.6. Bestimmung der Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung der Dotterproteine 1, 2 und 3.

[^{14}C]Tyrosin markierte Dotterproteine wurden durch zweidimensionale PAGE getrennt und einzeln alkalisch hydrolysiert. Die Hydrolysate wurden durch Dünnschichtelektrophorese (1) und aufsteigende Chromatographie (2) analysiert. Dies erlaubte die Trennung von Tyrosin von Tyrosinsulfat (rechts, schraffierte Flecken) als auch von anderen Aminosäuren (rechts, nicht schraffierte Kreise). Wie für Dotterprotein 1 gezeigt, wurden die Celluloseplatten autoradiographiert (links). Die gepunkteten Linien geben die Positionen von komigriertem Tyrosin- bzw. Tyrosinsulfatstandard nach Anfärbung mit Ninhydrin wieder.

	^{14}C -Tyrosin	^{14}C -Tyrosinsulfat	$\frac{^{14}\text{C}\text{-Tyrosinsulfat}}{^{14}\text{C}\text{-Tyrosin gesamt}}$	Anzahl der Tyrosin- reste pro Protein	$\frac{\text{Tyrosinsulfat}}{\text{Protein}}$
	(cpm)	(cpm)	(Prozent)		(Mol / Mol)
Dotterprotein 1	10 042	1478	12,8	17	2,2
Dotterprotein 2	5 009	279	5,3	17	0,9
Dotterprotein 3	4 044	469	10,4	12	1,2

Tab.5.2.: Die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung der Dotterproteine 1, 2 und 3. Wie in Abb.4.6. gezeigt, wurde [^{14}C]Tyrosin von [^{14}C]Tyrosinsulfat in den alkalischen Hydrolysaten von Dotterprotein 1, 2 und 3 getrennt. Die [^{14}C]-Radioaktivität, die in den einzelnen Flecken bestimmt wurde, wurde mit dem Wiederauffindungswert von [^{14}C]Tyrosinstandard (76,1% $\pm$ 1,9 (SD); n=3) bzw. [^{14}C]Tyrosinsulfatstandard (78,6% $\pm$ 1,7 (SD); n=3) korrigiert. Diese Werte sind in der ersten und zweiten Spalte aufgeführt. Das Verhältnis von Tyrosinsulfat zu gesamten Tyrosin (Summe der Werte von erster und zweiter Spalte) ist in Prozent in der dritten Spalte gezeigt. Die Anzahl der Tyrosinreste in den jeweiligen Dotterproteinen ist in der vierten Spalte gezeigt (Literaturhinweise siehe Text; 440 Aminosäurereste wurden für Dotterprotein 3 angenommen). Das Produkt der Werte in der dritten und vierten Spalte ergibt die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung (fünfte Spalte).

und 2. Spalte) und mit den erhaltenen Werten der durchschnittliche Prozentsatz sulfatierter Tyrosinreste ausgerechnet (Tab.5.2., 3. Spalte). Da die Anzahl der Tyrosinreste pro Polypeptid bei den Dotterproteinen 1 und 2 durch DNA-Sequenzierung (Hovemann et al., 1981; Hung und Wensink, 1981; Hung und Wensink, 1983) bekannt sind und bei Dotterprotein 3 aus der Aminosäurezusammensetzung (Mintzas und Kambysellis, 1982) bestimmt werden kann, konnte die durchschnittliche Anzahl der Tyrosinsulfatreste pro Polypeptid errechnet werden (Tab.5.2., 4. und 5. Spalte). Demnach hat Dotterprotein 1 rund 2,2, Dotterprotein 2 rund 0,9 und Dotterprotein 3 rund 1,2 Mole Tyrosinsulfat pro Polypeptidkette.

Wenn die gesamten mit (^3H)Tyrosin markierten Proteine von weiblichen oder männlichen Fliegen wie oben beschrieben analysiert wurden, ergab sich, daß durchschnittlich 1% aller Tyrosinreste in Proteinen von Weibchen und 0,4% aller Tyrosinreste in Proteinen von Männchen sulfatiert vorlagen.

5.6. Die Dotterproteine 1, 2 und 3 haben unterschiedliche Sulfopeptidmuster.

In vivo mit (^{35})Sulfat markierte Dotterproteine wurden durch zweidimensionale SDS-PAGE isoliert und in Gelstücken mit Trypsin verdaut. Die mit Trypsin verdauten Proben wurden zweidimensional durch Dünnschichtelektrophorese und aufsteigende Chromatographie getrennt (Abb.5.7., rechts

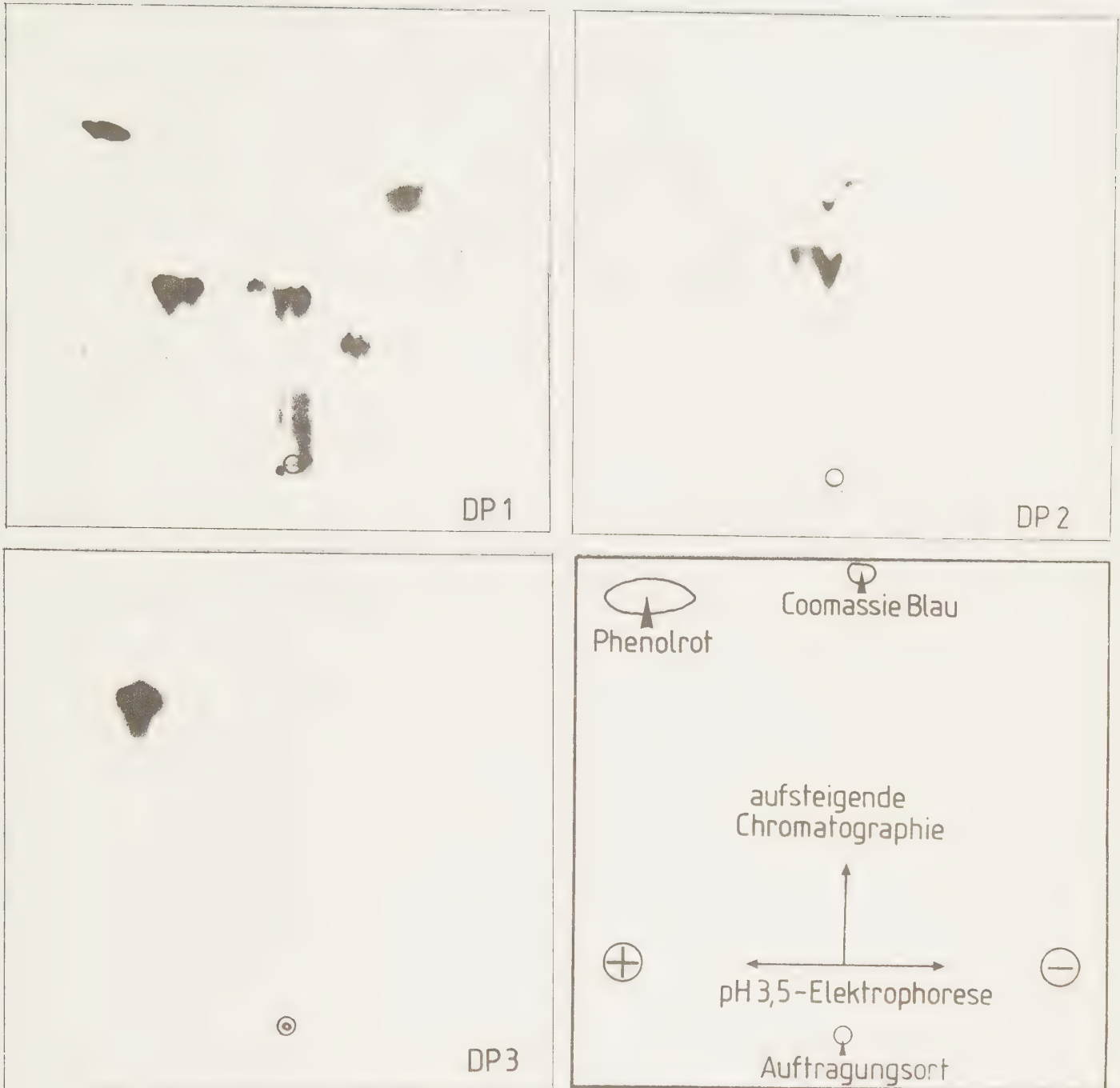


Abb.5.7.: Sulfopeptidkartierung der Dotterproteine 1, 2 und 3. In vivo mit [^{35}S]Sulfat markierte Dotterproteine (DP) wurden durch zweidimensionale PAGE getrennt und für 48 Stunden mit TPCK-Trypsin verdaut. Die verdauten Proben wurden, wie in der Abbildung rechts unten beschrieben, auf Dünnschichtcellulose analysiert und die Platten anschließend autoradiographiert.

unten) und die Celluloseplatten anschließend autoradiographiert (Abb.5.7.). Dotterprotein 1 ergab selbst nach über 80 Stunden Verdauzeit immer noch mindestens 6 Sulfopeptide, was auf das Vorhandensein mehrerer Tyrosinsulfatierungsstellen im Protein hindeutet. Dotterprotein 3 ergab nur ein Sulfopeptid. Dotterprotein 2 ergab nach 48 Stunden Verdau zwei (Abb.5.7.) bis drei (6.9., Kontrolle) Sulfopeptide.

DISKUSSION

Die haupttyrosinsulfatierten Proteine weiblicher *Drosophila* Fliegen wurden durch Immunomarkierung als die drei Dotterproteine identifiziert. Daß die Sulfatmarkierung dieser Proteine im Vergleich zu anderen sulfatierten Proteinen so dominant war, wird dadurch erklärt, daß diese Proteine erstens sehr abundant sind (in Kapitel 5 ist gezeigt, daß diese Proteine ca 6% der gesamten Proteine in weiblichen Fliegen darstellen) und zweitens eine sehr hohe Syntheserate haben (siehe Mahowald und Kambyssellis, 1981). Die Dotterproteine gehören ferner zu den hauptsekretorischen Proteinen weiblicher Fliegen. Als Proteinsubstrate der Tyrosylprotein Sulfotransferase fallen die Dotterproteine wiederum in die topologische Klasse der sekretorischen Proteine (vgl. Tab.E2).

Alle drei Dotterproteine sind ausschließlich und stöchiometrisch an Tyrosinresten sulfatiert. Dies war nicht notwendigerweise zu erwarten, da die Proteine nur zu ca 50% homolog sind (gezeigt für Dotterprotein 1 und 2; Hung und Wensink, 1983). Offenbar wurden in der Evolution der drei Proteine aus einem Vorläuferprotein die kovalente Modifizierung durch Tyrosinsulfatierung konserviert.

Die beobachteten isoelektrischen Varianten der Dotterproteine wurden offensichtlich nicht durch unterschiedliche Grade von Tyrosinsulfatierung

hervorgerufen, da alle Varianten innerhalb einer Dotterproteinspezies ein gleiches (^{35}S)Sulfat- zu (^3H)Tyrosin-Verhältnis zeigten. Da die Dotterproteine auch durch Phosphorylierung modifiziert sind (Brennan and Mahowald, 1982), ist es möglich, daß die isoelektrischen Varianten durch unterschiedliche Grade von Phosphorylierung hervorgerufen wurden. Daß die isoelektrischen Varianten durch unterschiedliche Grade von Sialylierung an N-gebundenen Oligosacchariden hervorgerufen wurden, ist unwahrscheinlich, da die Dotterproteine offenbar nicht N-glykosyliert sind. Dotterprotein 1 hat in seiner Aminosäuresequenz keinen N-glykosylierbaren Asparaginrest (Asn-X-Ser/Thr; siehe Kornfeld und Kornfeld, 1985) (Sequenz siehe Hovemann et al., 1981, Hung und Wensink, 1981). Dotterprotein 2 hat eine N-Glykosylierungsstelle nahe dem N-Terminus (Sequenz siehe Hung und Wensink, 1983; Abb.6.7.). Diese wird jedoch offensichtlich nicht modifiziert, da Dotterprotein 2, das in L-Zellen der Maus exprimiert wurde und das mit Dotterprotein 2 aus Fliegen in SDS-Gelen komigriert, sein Migrationsverhalten nicht veränderte, nachdem die L-Zellen mit Tunicamycin behandelt wurden (Friederich und Huttner, unpubliziert). Eine Analyse von gereinigtem Dotterprotein 2 ergab einen Kohlenhydratgehalt von 7,5% (Mintzas und Kambysellis, 1982). Dies deutet auf die Anwesenheit von O-gebundenen Oligosacchariden hin.

Das Gen von Dotterprotein 2 ist kloniert und sequenziert worden (Hovemann und Galler, 1983; Hung und Wensink, 1983).

Damit ist auch die Aminosäuresequenz des Proteins bekannt, was die Identifizierung der Tyrosinsulfatierungsstelle(n) erheblich erleichtert. Der Befund, daß Dotterprotein 2 ca 1 Mol Tyrosinsulfat pro Mol Protein enthält, deutet darauf hin, daß nur eine Tyrosinsulfatierungsstelle im Protein vorhanden ist. In Dotterprotein 1 sind es mindestens zwei. Dotterprotein 3, das wahrscheinlich auch nur eine Tyrosinsulfatierungsstelle besitzt, ist noch nicht sequenziert worden. Demzufolge scheint Dotterprotein 2 der vielversprechendste Kandidat für ein Modellprotein zu sein, das durch gerichtete Mutagenese der Tyrosinsulfatierungsstelle untersucht werden kann. Obgleich die Sulfopeptidkartierung von Dotterprotein 2 zwei Flecken zeigt (Abb.5.7.), muß dies nicht gleichbedeutend mit mehreren Tyrosinsulfatierungsstellen sein. Unterschiedliche Sulfopeptide, können die gleiche Tyrosinsulfatierungsstelle enthalten, wenn z.B. eine überlappende tryptische Spaltstelle am C-Terminus die Heterogenität der Sulfopeptide verursacht hat (siehe Kapitel 6). Um die Anzahl und die Sequenzposition von Tyrosinsulfatierungsstellen zu bestimmen, müssen die Sulfopeptide von Dotterprotein 2 präparativ gereinigt und durch N-terminale Sequenzierung sowie Aminosäureanalyse identifiziert werden. Dies wird im folgenden Kapitel durchgeführt.

K A P I T E L 6

DIE IDENTIFIZIERUNG DER TYROSINSULFATIERUNGSSTELLE
IN DOTTERPROTEIN 2

EINFÜHRUNG

In diesem Kapitel wird abgeklärt, ob Dotterprotein 2 von *Drosophila melanogaster* ein tyrosinsulfatiertes Protein ist, das alle Forderungen erfüllt, die an ein Modellprotein zur Untersuchung funktioneller Aspekte der Tyrosinsulfatierung gestellt werden. Im vorangehenden Kapitel wurde gezeigt, daß Dotterprotein 2 stöchiometrisch mit 1 Mol/Mol und ausschließlich an Tyrosinresten sulfatiert ist. Um die Rolle der Tyrosinsulfatierung in diesem Protein mit Hilfe gentechnologischer Methoden zu untersuchen, ist es zum einen notwendig zu zeigen, welcher der Tyrosinreste in Dotterprotein 2 sulfatiert ist und zum anderen, daß nur einer der 17 Tyrosinreste in Dotterprotein 2 sulfatiert ist und nicht etwa mehrere Reste substöchiometrisch sulfatiert sind. Das Kodon eines identifizierten, sulfatiert vorkommenden Tyrosinrestes kann dann auf DNA-Ebene so mutiert werden, daß das mutierte Protein z.B. einen nicht sulfatierbaren aber strukturell sehr ähnlichen Phenylalaninrest an dessen Stelle besitzt. Es wird erwartet, daß das mutierte Protein in vivo nicht mehr sulfatiert werden kann oder alternativ an anderen

Tyrosinresten sulfatiert wird. Im ersten Fall können das mutierte und das Wildtyp-Protein direkt im Vergleich untersucht werden. Dies kann zum einen in heterologen Zellkulturen nach Transfektion der Gene geschehen, womit sich eine intrazelluläre, präsekretorische Funktion der Tyrosinsulfatierung untersuchen ließe. Zum anderen kann das mutierte Gen gewebsspezifisch in Fliegen mit Hilfe des P-Elements exprimiert werden. Dabei ließen sich auch im Organismus Einflüsse der Mutation auf Vorgänge nach der Sekretion untersuchen, wie z.B. auf die Stabilität des mutierten Proteins in der Hämolymphe, seine Aufnahme in Oozyten oder auf seine Degradierung in Embryonen.

ZUSAMMENFASSUNG

Um seine Tyrosinsulfatierungsstelle(n) zu bestimmen, mußte Dotterprotein 2 zunächst aus in vivo mit (^{35}S)Sulfat markierten Fliegen gereinigt werden. Nachdem die drei Dotterproteine 1, 2 und 3 aus Homogenaten ganzer Fliegen zusammen extrahiert wurden, wurde Dotterprotein 2 von den sehr ähnlichen Dotterproteinen 1 und 3 durch präparative zwei-dimensionale Gelelektrophorese abgetrennt. Durch direkte Behandlung der Dotterprotein 2 enthaltenden Gelstücke mit Trypsin konnten quantitativ (^{35}S)Sulfat markierte Sulfopeptide isoliert werden. Nach Anreicherung durch C_{18} -Chromatographie wurden Sulfopeptide durch HPLC aufgetrennt. Für das Dotterprotein 2 wurden zwei tryptische Sulfopeptide gefunden, die nahezu alle ^{35}S -Radioaktivität enthielten. Durch aminoterminaler Gasphasensequenzierung der tryptischen Peptide wurde gezeigt, daß sie gleiche N-Termini besaßen. Aminosäureanalysen ergaben, daß die zwei Peptide wahrscheinlich das Resultat überlappender tryptischer Spaltstellen waren und den Sequenzpositionen 162-190 und 162-189 von Dotterprotein 2 entsprachen. Da die zwei Sulfopeptide je drei Tyrosinreste enthielten, wurden sie mit Chymotrypsin subverdaut. Die resultierenden Sulfopeptide besaßen wiederum gleiche N-Termini, enthielten aber nur noch einen einzigen Tyrosinrest. Dieser entsprach der Sequenzposition 172 des Vorläufers von Dotterproteins 2 und ist in der Sequenz Glu-Thr-Thr-Asp-Tyr(S)-Ser-Asn-Glu-Glu enthalten. Tyrosin 172 ist damit die einzige Sulfatierungsstelle in Dotterprotein 2.

ERGEBNISSE

6.1. Reinigung von Dotterprotein 2 aus Fliegen von *Drosophila melanogaster*

Die einzelnen Reinigungsschritte sind in dem Schema 6.1. zusammengefasst.

Um die Menge der drei Dotterproteine während der Reinigung bestimmen zu können, wurden den Fliegen, die in Massenkultur angezüchtet wurden, in vivo mit (^{35}S)Sulfat markierte Fliegen zugesetzt. Gleiche Anteile (1%) der Fraktionen A, B, C und D, die während der Reinigung erhalten wurden (siehe Schema 6.1.), wurden durch SDS-PAGE, gefolgt von Proteinfärbung mit Coomassie Blau (Abb.6.1., linke Hälfte) und Fluorographie (Abb.6.1., rechte Hälfte) analysiert. Um den durchschnittlichen Anreicherungsfaktor für die drei Dotterproteine in den einzelnen Schritten zu bestimmen (Tab.6.1.), wurde in den sulfatmarkierten Gelbanden mit einer apparenten Molmasse um 45 kDa (Abb.6.1., rechte Hälfte), die den Dotterproteinen 1, 2 und 3 entsprachen (siehe Kapitel 5), die Radioaktivität bestimmt.

Da die Dotterproteine nur bei hoher Ionenstärke löslich sind (Warren und Mahowald, 1979), wurden die Fliegen in einem Puffer mit 0,5 M NaCl homogenisiert (Fraktion A; Abb.6.1.). Reste der Cuticula und anderes unlösliches Material im Homogenat wurden durch Ultrazentrifugation entfernt. Der Überstand (Fraktion B; Abb.6.1.) enthielt 51% der

REINIGUNGSSCHEMA FÜR DAS DOTTERPROTEIN 2

In vivo-Markierung von adulten Drosophila-Fliegen
mit ^{35}S -Sulfat (Lagerung der Fliegen bei -70°C)

Homogenisierung der Fliegen in Glas-Teflon-Homogenisator
bei 3000 rpm durch 10 Passagen (Puffer mit 0,5 M NaCl) **A**

Ultrazentrifugation des Homogenates für 3 Stunden bei 150 000 x g

B Überstand Niederschlag

Dialyse gegen 1 mM HEPES-
Puffer

Zentrifugation (20 min, 10 000 x g)

Überstand

Niederschlag

Auflösen in Puffer mit 0,5 M NaCl **C**

Zugabe von gesättigter Ammoniumsulfatlösung
bis zur 40-prozentigen Sättigung

Zentrifugation (20 min, 10 000 x g)

Überstand

Niederschlag

Dialyse gegen 1mM HEPES-Puffer

Zentrifugation (20 min, 10 10000 x g)

Auflösen des Niederschlags in 1 % SDS **D**

Acetonpräzipitation der Proteine

Auflösen der Proteine in Harnstoff-Lysis-Puffer

Zwei-dimensionale SDS-Gelelektrophorese

Ausschneiden des Dotterprotein 2-Flecks

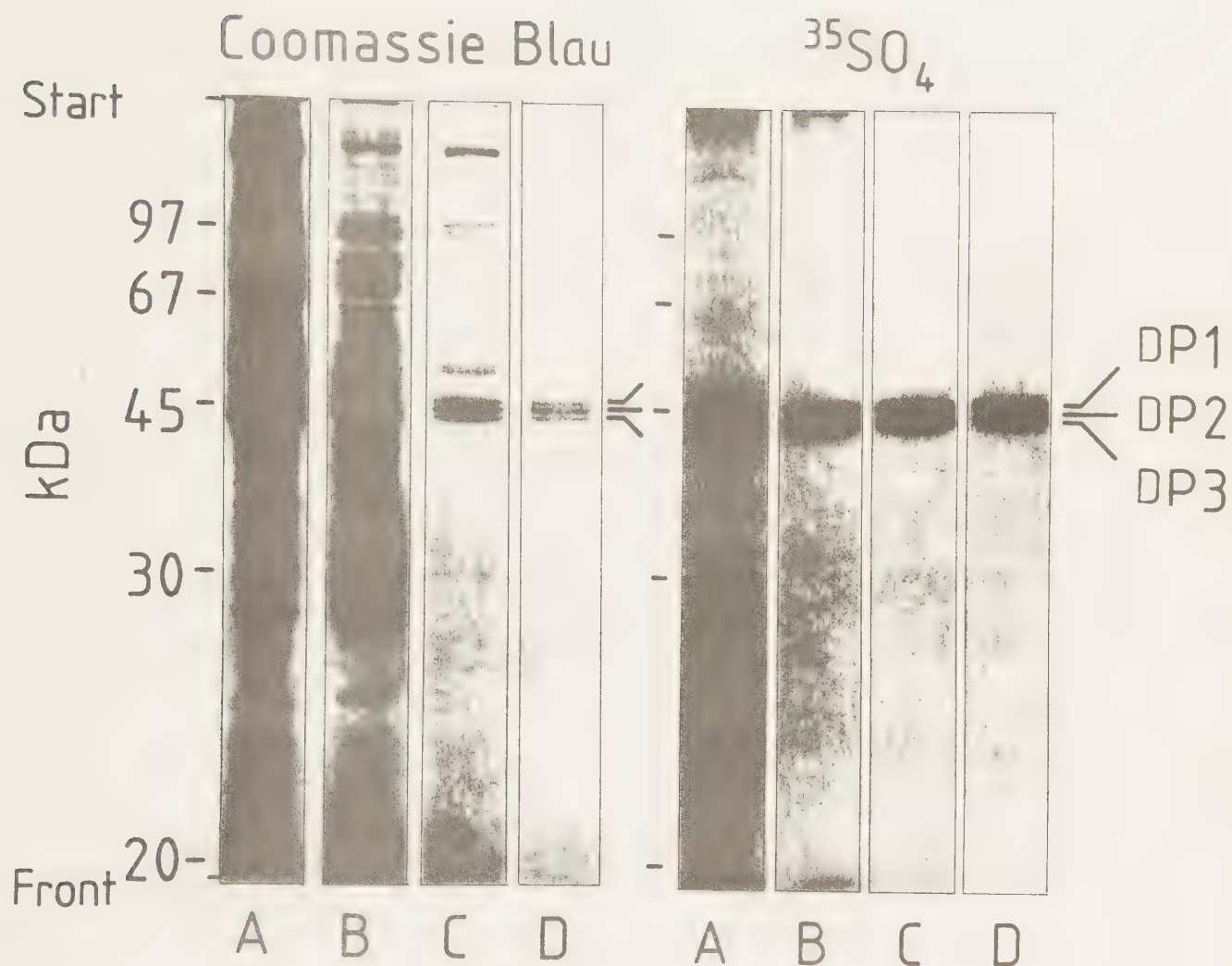


Abb.6.1.: Reinigung der Dotterproteine 1, 2 und 3 aus *Drosophila*fliegen. Analyse der Fraktionen durch SDS-PAGE und Fluorographie. Gleiche Anteile der Fraktionen (1%), die während der einzelnen Reinigungsschritte anfielen, wurden nach SDS-PAGE durch Proteinfärbung mit Coomassie Blau (links) und durch Fluorographie ($^{35}\text{SO}_4$) analysiert. A: Gesamthomogenat; B: 100000xg überstand; C: Präzipitat in niedriger Ionenstärke; D: Überstand nach Ammoniumsulfatfällung, gefolgt von Präzipitation in niedriger Ionenstärke. Die Positionen von Molekulargewichtstandards sind links und die der Dotterproteine (DP) rechts angezeigt.

Dotterprotein-spezifischen Radioaktivität des Homogenates (Fraktion A) und die Dotterproteine um den Faktor 1,6 angereichert (Tab.6.1.). Die Fraktion B wurde ausgiebig gegen einen Puffer mit niedriger Ionenstärke dialysiert. Das resultierende Präzipitat, das wieder in Puffer mit hohem Salz aufgelöst wurde (Fraktion C; Abb.6.1.), enthielt die Dotterproteine um einen Faktor von 11,1 gegenüber dem Homogenat angereichert (Tab.6.1.). In der Fraktion C waren noch 42% der Dotterprotein-spezifischen Radioaktivität vorhanden (Tab.6.1.). Die meisten der in Fraktion C verbliebenen Proteinkontaminanten konnten durch Zugabe von 40%-gesättigter Ammoniumsulfatlösung zu der in hohem Salz gelösten Fraktion C ausgefällt werden. Der resultierende Überstand wurde dialysiert und der dabei entstandene Niederschlag durch Zentrifugation gesammelt und in 1% SDS aufgelöst (Fraktion D; Abb.6.1.). Fraktion D enthielt noch 31% der Dotterprotein-spezifischen Radioaktivität und die drei Proteine um einen durchschnittlichen Faktor von 27 gegenüber dem Homogenat angereichert (Tab.6.1.).

Um zu testen, ob während der Reinigungsprozedur eine Desulfatierung der Dotterproteine auftrat (was die auf (^{35}S)Sulfat-Werten basierenden Ausbeuten und Reinigungsfaktoren dieser Proteine (Tab.6.1.) nach unten verfälschen würde), wurden zu Beginn einer Aufreinigung (anstelle von sulfatmarkierten Fliegen) Fliegen zugegeben, die mit (^{35}S)Sulfat und (^3H)Tyrosin doppel-markiert waren. Dabei wurde festgestellt, daß sich während der Reinigung das

Fraktion	Dotterprotein-spezifische ^{35}S -Radioaktivität pro Fraktion	Ausbeute an spezifischer ^{35}S -Radioaktivität	Protein pro Fraktion	spezifische ^{35}S -Radioaktivität pro mg Protein	Reinigungsfaktor
	$\text{cpm} \times 10^{-3}$	Prozent	mg (Prozent)	$\text{cpm} \times \text{mg}^{-1}$	
A	12 991	100	381 (100)	34 132	
B	6 698	51,2	127 (33,3)	52 788	1,6
C	5 396	41,5	14,2 (3,7)	380 004	11,1
D	4 008	30,8	4,4 (1,2)	910 841	26,7

Tab.6.1.: Reinigung der Dotterproteine 1, 2 und 3 aus Drosophilafliegen. Nach SDS-PAGE und Fluorographie wurden die Dotterproteine aus den Gelen ausgeschnitten, die in ihnen enthaltene ^{35}S -Radioaktivität bestimmt (bezeichnet als spezifische Radioaktivität) (siehe Abb.6.1., rechts) und die gesamte Dotterprotein-spezifische Radioaktivität jeder Fraktion berechnet (erste Spalte). Daraus ließ sich die Ausbeute der Proteine nach jedem Reinigungsschritt bestimmen (zweite Spalte). Aus den Proteinkonzentrationen der einzelnen Fraktionen (dritte Spalte) ließ sich die spezifische Radioaktivität pro mg Protein berechnen (vierte Spalte). Die Reinigungsfaktoren wurden berechnet, in dem der Wert für das Gesamthomogenat (A) gleich 1,0 gesetzt wurde (fünfte Spalte).

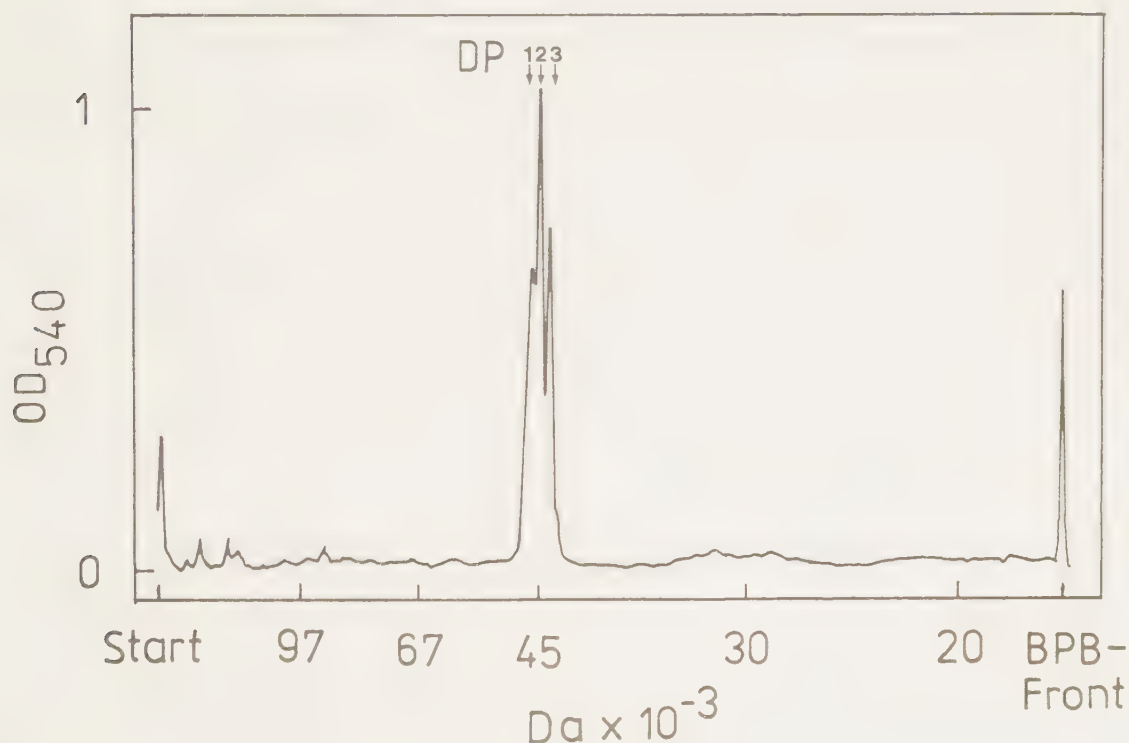


Abb.6.2.: Bestimmung der Reinheit der Dotterproteinfraktion (D). Die Absorption eines Coomassie Blau gefärbten 11%-SDS-Geles, auf dem ein Aliquot der Dotterproteinfraktion D (siehe Abb.6.1.; Tab.6.1.) aufgetrennt wurde, wurde bei 540 nm (OD_{540}) aufgezeichnet. Aus der gesamten integrierbaren Fläche der Aufzeichnung (inklusive Bromphenolblaufront (BPB) und im Start präzipitiertes Material) wurde berechnet, daß die Dotterproteine 1, 2 und 3 (DP) 80% der Gesamtfläche darstellen.

Verhältnis von ^{35}S - zur ^3H -Radioaktivität in den Dotterproteinen durchschnittlich um den Faktor 1,5 erhöht hatte (Dotterprotein 2: 1,4-fach). Dies schließt aus, daß eine Desulfatierung während der Aufreinigung stattfand. Die leichte Erhöhung des ^{35}S zu ^3H -Verhältnisses könnte darauf beruhen, daß (unsulfatierte) ^3H -Kontaminanten, die im 2D-Gel mit den Dotterproteinen komigrierten, weggereinigt wurden.

Die Reinheit der Fraktion D wurde durch Aufzeichnung von Coomassie Blau-gefärbten SDS-Gelen bei 540 nm untersucht (Abb.6.2.) und ergab, daß die Peakflächen der Dotterproteine 1, 2 und 3 80% der gesamten integrierbaren Fläche der Gelaufzeichnung ausmachten. Wie aus den Peakflächen der Gelaufzeichnung bestimmt werden konnte, enthielt Fraktion D 24% Dotterprotein 1, 32% Dotterprotein 2 und 24% Dotterprotein, unter der Annahme, daß die drei Dotterproteine gleich gut mit Coomassie Blau anfärbbar sind.

Wenn die Dotterproteine in den Fraktionen B, C und D einzeln untersucht wurden (nicht abgebildet), stellte sich heraus, daß ihre Wiederfindungsfaktoren leicht unterschiedlich waren. Dotterprotein 2 wurde besser als Dotterprotein 1 und 3 angereichert.

Ausgehend von Fraktion D wurde Dotterprotein 2 von den sehr ähnlichen Dotterproteinen 1 und 3 durch präparative zweidimensionale Gelelektrophorese abgetrennt, wie durch Coomassieblaufärbung (Abb.6.3., oben) und Fluorographie (Abb.6.3., unten) gezeigt ist. Obwohl nach

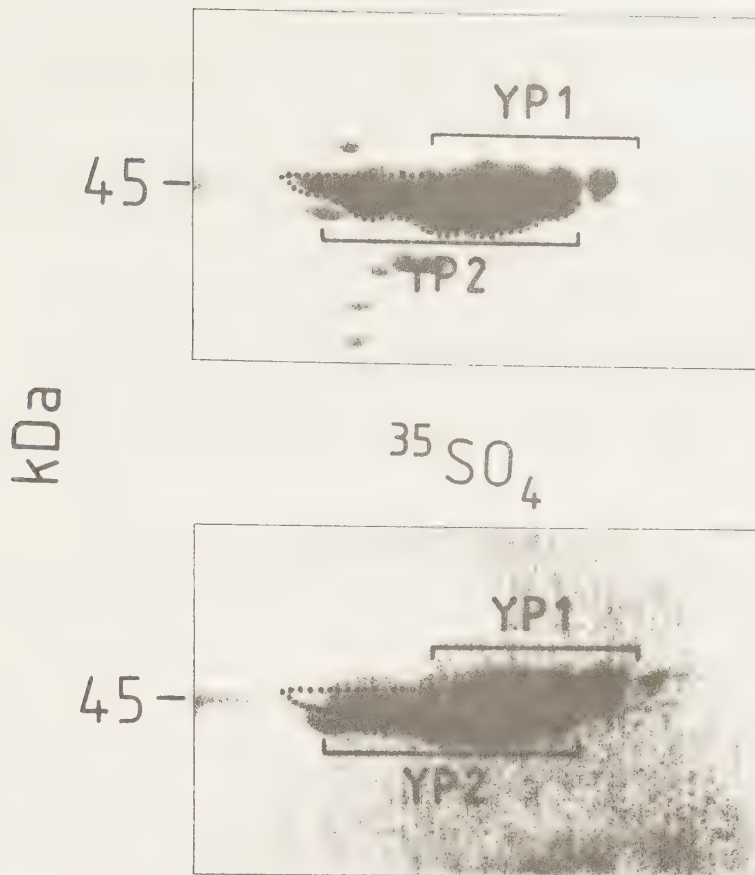


Abb.6.3.: Präparative zweidimensionale Trennung der Dotterproteine 1, 2 und 3. Proteine der Proteinfraction D (siehe Abb.6.1. und 6.2.) wurden durch zweidimensionale PAGE getrennt. Ein repräsentatives Gel wurde mit Coomassie Blau gefärbt (oben) und anschließend fluorographiert (unten). Nur der Ausschnitt des Gels, der die isoelektrischen Varianten der Dotterproteine 1 und 2 beinhaltet, ist gezeigt. Die Position eines Molekulargewichtstandards (45 kDa) und die Positionen der Dotterproteine 1 und 2 (DP) sind gezeigt. Eine gepunktete Linie zeigt, wie die Varianten des Dotterproteins 2 aus dem Gel ausgeschnitten wurden.

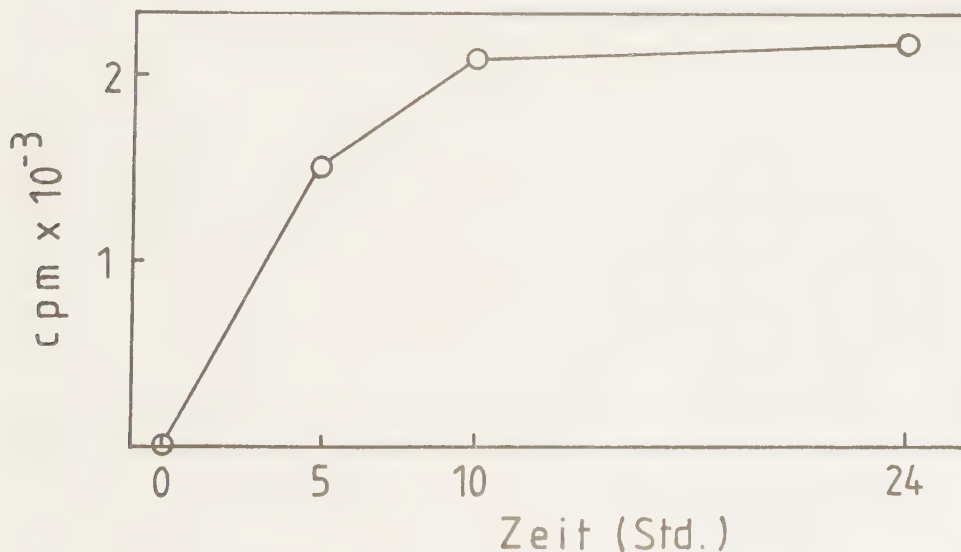


Abb.6.4.: Kinetik der Elution tryptischer Sulfopeptide aus Polyacrylamidgelen. Polyacrylamidstücke, in denen nach zweidimensionaler PAGE [^{35}S]Sulfat markiertes Dotterprotein 3 enthalten war, wurden mit einem trypsinhaltigen Puffer inkubiert und nach den angegebenen Zeiten in Aliquoten des Eluates die Radioaktivität bestimmt. Ein Elutionsprofil für die Sulfopeptide des Dotterproteins 3 ist gezeigt.

elektrophoretischer Trennung noch einige Isoformen von Dotterprotein 1 direkt an Isoformen von Dotterprotein 2 angrenzten (Abb.6.3.), war die gegenseitige Kontamination nach Herausschneiden der entsprechenden Formen gering, wie den unterschiedlichen (^{35}S)Sulfopeptidmustern und Gesamtpeptidmustern von Dotterprotein 1 und 2 nach HPLC entnommen werden kann (vgl. Abb.6.5. und Abb.6.6.).

6.2. Nahezu alle (^{35}S)Radioaktivität von Dotterprotein 2 kann in zwei tryptischen Sulfopeptiden isoliert werden.

Die einzelnen Reinigungsschritte für die Sulfopeptide sind in dem Schema 5.2. zusammengefasst.

Nach zweidimensionaler Elektrophorese wurden die Gelstücke, die Dotterprotein 2 enthielten, mit Trypsin behandelt. Wie in Abb.6.4. für Dotterprotein 3 gezeigt ist, erreichte die Elution von ^{35}S -Radioaktivität aus den Gelstücken nach etwas mehr als 10 Stunden ein Plateau. Durch wiederholte Elution der Gelstücke (bei gleichzeitigem tryptischen Verdau) konnten schließlich mehr als 95% der (^{35}S)Sulfatmarkierung in Dotterprotein 2 eluiert werden, die durch H_2O_2 -Behandlung eines Gelstückes mit gleicher Proteinmenge eluierbar war. Die mit Trypsin verdauten Proben wurden anschließend bei pH 8,5 durch eine C_{18} -Kapsel gepresst. Dabei wurde Coomassie Blau vollständig absorbiert. Gebundenes Material wurde zuerst mit 20%, dann mit 100% Methanol eluiert. Wie in Tab.6.2. gezeigt, konnten in zwei unabhängigen Experimenten

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG TRYPTISCHER

SULFOPEPTIDE VON DOTTERPROTEIN 2 UND 1

Coomassie Blau gefärbte Gelstücke von
zweidimensionalen Gelen mit Dotterprotein 2

Entfärben, Fixieren, Waschen, Zerkleinern und
Gefriertrocknen der Gelstücke

Aufschwellen in Ammoniumbikarbonatpuffer mit
Trypsin

48 Stunden, 30°C, zweimalige Reelution der Gelstückchen

Passage des Eluates über C₁₈-SEP PAK- Kapsel



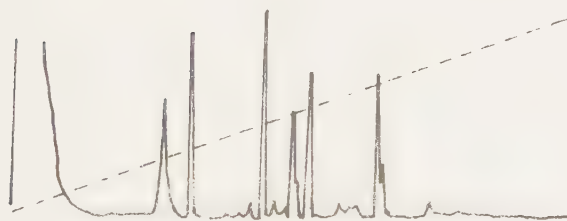
Durchfluß

1. Elution mit 20% Methanol → 20% Methanol-Eluat

2. Elution mit 100% Methanol → 100% Methanol Eluat

Einengung der Eluate und

H P L C



Sammlung aller Fraktionen

Gesamtausbeute an
³⁵S-Radioaktivität

Identifizierung von
Sulfopeptiden

Rechromatographie von
Sulfopeptiden

N-terminale Sequenzierung

Aminosäureanalyse

Subverdau

	Tryptisches Eluat aus Gelstück		Fraktionen der C ₁₈ -Chromatographie		Summe der Fraktionen nach HPLC		Sulfopeptide A und B	
	cpm (Prozent)		cpm (Prozent)		cpm (Prozent)		cpm (Prozent)	
Experiment Nr. 1	63 000 (100)		9 700 a					
			55 200 b	(67)	37 480		35 540	
			(88)		(59)		(56)	
Experiment Nr. 2	54 000 (100)		7300 a					
			49950 b	(78)	30 420		27 530	
			(94)		(54)		(45)	

a : Durchfluß
b : Eluat mit 20 % Methanol
c : Eluat mit 100 % Methanol

Tab.6.2.: Wiederauffindung der ³⁵S-Radioaktivität in tryptischen Sulfopeptiden von Dotterprotein 2.
In Aliquoten der Fraktionen, die während der einzelnen Reinigungsschritte der Sulfopeptide anfielen (siehe Flußschema 6.2.), wurde die Radioaktivität bestimmt und die gesamte Radioaktivität einer jeweiligen Fraktion berechnet. Dies wurde für zwei unabhängige Präparationen durchgeführt (Experiment Nr.1 und Nr. 2). Die Wiederauffindungswerte sind in Prozent ausgedrückt und wurden auf das tryptische Eluat bezogen.

87-94% der applizierten Radioaktivität in der Summe aus Durchfluß-, 20%-Methanol- und 100%-Methanol-Fraktion wiedergefunden werden.

Die Durchflußfraktion enthielt 13-18% und die 20%-Methanolfraktion 76-87% der wiederauffindbaren ^{35}S -Radioaktivität. Die 100%-Methanolfraktion, in der alles Coomassie Blau enthalten war, enthielt weniger als 6% der Radioaktivität und wurde nicht weiter analysiert. Nach Analyse der Durchflußfraktion durch HPLC fand sich der Großteil der ^{35}S -Radioaktivität in Peptiden, die mit 7-11% Acetonitril von der Reverse-Phase-Säule (Vydac) eluiert wurden (nicht abgebildet). Das Sulfopeptidmuster dieser Fraktion glich sehr dem von Dotterprotein 1. Daher ist es wahrscheinlich, daß die in der Durchflußfraktion von Dotterprotein 2 gefundenen Sulfopeptide von Dotterprotein 1 stammen, das den Dotterprotein 2 Fleck geringfügig kontaminierte.

Tryptische Sulfopeptide von Dotterprotein 2, die in der 20%-Methanolfraktion enthalten waren, wurden durch HPLC analysiert. Das Absorptionsprofil bei 206 nm ist im unteren Teil von Abb.6.5. gezeigt. In Aliquots der Fraktionen wurde die Radioaktivität bestimmt, um die Positionen von (^{35}S)Sulfat-markierten Sulfopeptiden zu ermitteln. Das Profil der ^{35}S -Radioaktivität ist im oberen Teil der Abb.6.5. gezeigt. Nach HPLC konnten ca 80% der applizierten Radioaktivität in den Fraktionen wiedergefunden werden. Von der wiedergefundenen Radioaktivität waren mehr

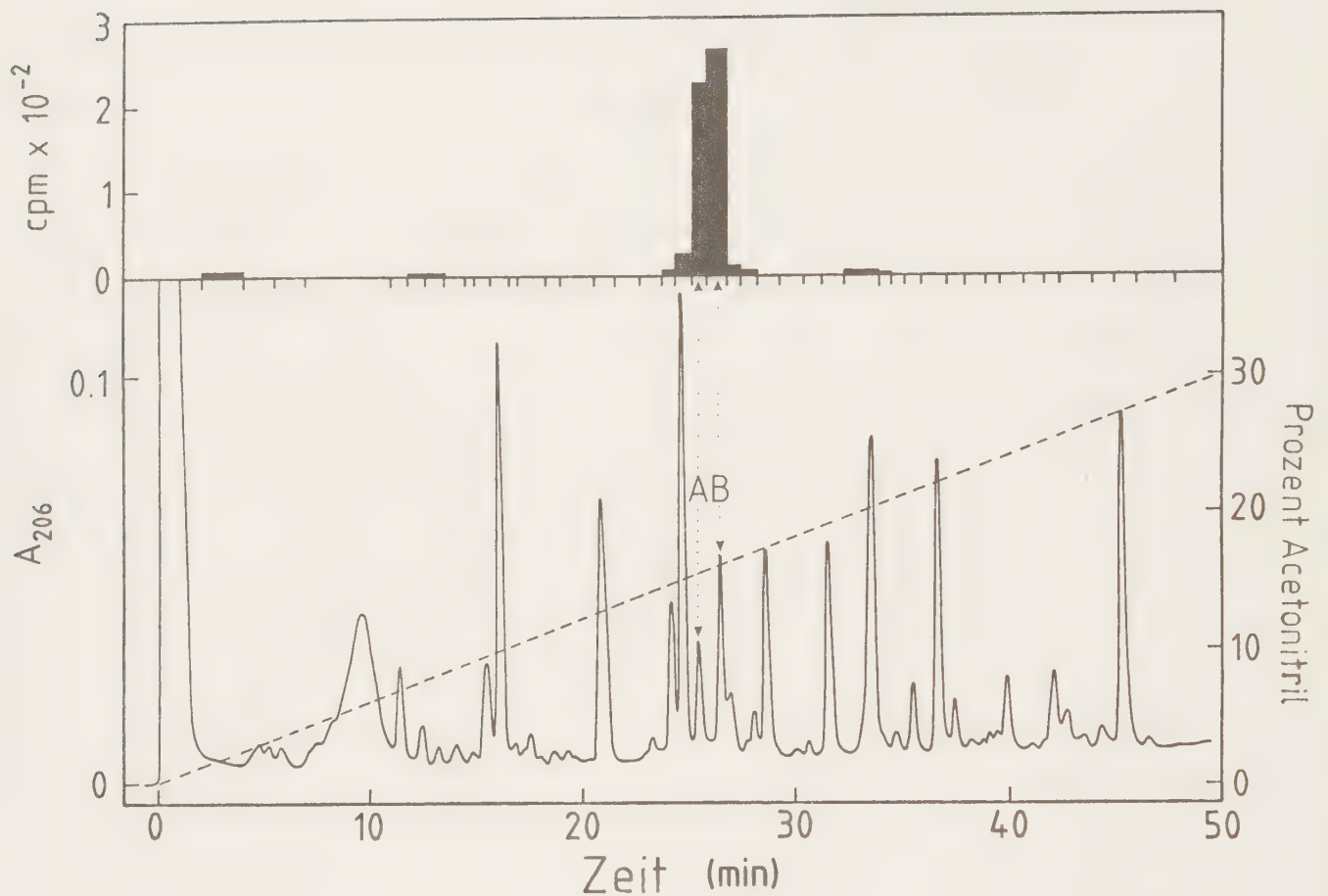


Abb.6.5.: Auftrennung einer tryptischen Peptidfraktion von Dotterproteins 2 durch HPLC und Identifizierung von tryptischen Sulfopeptiden. Durch zweidimensionale PAGE gereinigtes (^{35}S)Sulfat markiertes Dotterprotein 2 wurde durch Trypsinbehandlung aus dem Gel eluiert und die resultierenden Peptide, wie in Schema 6.2. gezeigt, aufgearbeitet. Die 20%-Methanolfraction wurde eingengt und nach Zugabe von Ameisensäure auf einer Reverse Phase Säule (Vydac) durch HPLC (LKB) analysiert. Das Elutionsprofil wurde in einem UV-Detektor (LKB) bei 206 nm aufgezeichnet. Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf des Acetonitrilgradienten. Die Peakfraktionen und Zwischenfraktionen (Striche unter der Mittellinie) wurden gesammelt und in Aliquoten die Radioaktivität bestimmt. Die erhaltenen Werte sind im oberen Teil der Abbildung aufgetragen. Die gepunkteten Linien geben die Positionen der zwei tryptischen Sulfopeptiden an, die mit A und B bezeichnet wurden.

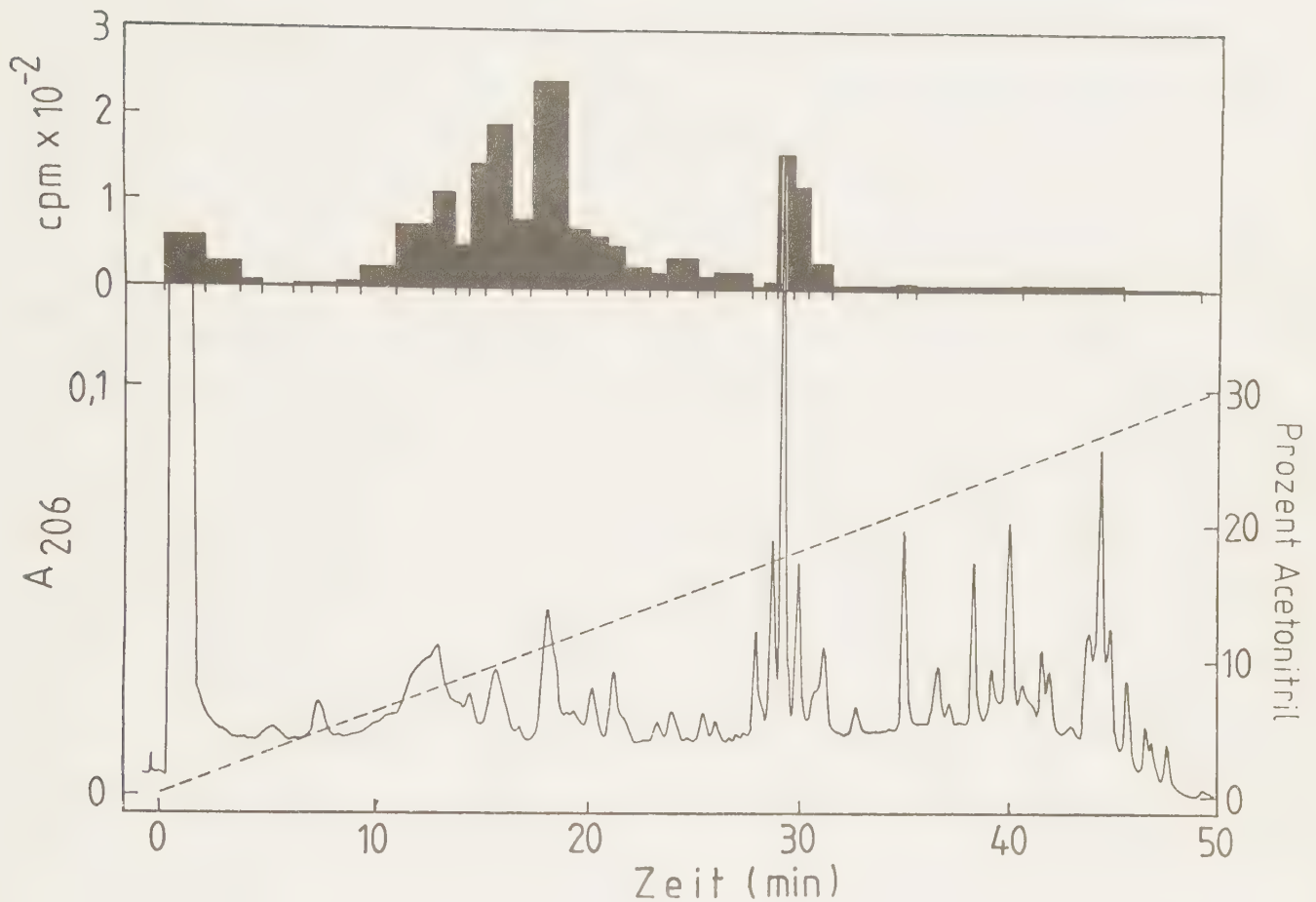


Abb.6.6.: Auftrennung tryptischer Peptide von Dotterprotein 1 und Identifizierung von Sulfopeptiden.

Die Durchflußfraktion, vereinigt mit der 20%-Methanolfraction (siehe Fließschema 6.2.) von (³⁵S)Sulfat markiertem Dotterprotein 1, wurde, wie für Dotterprotein 2 in Abb.6.5. beschrieben, durch HPLC analysiert. In Aliquoten der Peakfraktionen und Zwischenfraktionen wurde die ³⁵S-Radioaktivität bestimmt. Illustration siehe Abb.6.5.

als 90% in zwei Sulfopeptiden enthalten, die mit A und B bezeichnet wurden (Abb.6.5.).

Bis zu diesem Schritt waren in der Summe der beiden Sulfopeptide noch im Durchschnitt 50% der Radioaktivität auffindbar, die ursprünglich aus den Gelstücken eluiert wurde. Eine Rechromatographie der Sulfopeptide (Abb.6.9.; Kontrolle) bestätigte, daß die (^{35}S)Sulfatmarkierung mit den Absorptionsmaxima von 206 nm der Peptide komigrierte. Bei der Rechromatographie wurden für die Peptide A und B 67% bzw. 78% der ^{35}S -Radioaktivität wiedergefunden.

Daß nach HPLC nur zwei tryptische Sulfopeptide für Dotterprotein 2 gefunden wurden, deckt sich mit dem Ergebnis der Sulfopeptidkartierung (siehe Abb.5.7.), bei der gleichfalls zwei Sulfopeptide nachweisbar waren. Das HPLC-Sulfopeptidmuster von gereinigtem (^{35}S)Sulfat-markiertem Dotterprotein 2 war mit dem identisch, das erhalten wurde, wenn (^{35}S)sulfat-markiertes Dotterprotein 2, das zuvor durch analytische Gele präpariert worden war, erst kurz vor dem tryptischen Verdau zu nicht markiertem, gereinigten Dotterprotein 2 zugesetzt wurde (nicht abgebildet). Dies zeigt, daß die Reinigung das Sulfopeptidmuster von Dotterprotein 2 nicht verändert hat. Demnach sind auch keine Tyrosinsulfatierungsstellen während der Reinigung des Proteins spezifisch verlorengegangen.

6.3. Die zwei tryptischen Sulfopeptide A und B haben

gleiche N-Termini, die der Sequenzposition 162 von Dotterprotein 2 entsprechen und enthalten je drei Tyrosinreste.

Die beiden Sulfopeptide A und B wurden durch sequentiellen Edman-Abbau (Edman, 1949) der ersten fünf N-terminalen Aminosäuren in einem Gasphasensequenator analysiert (in Zusammenarbeit mit Dr. Lottspeich, Martinsried). Beide Peptide besaßen den gleichen N-Terminus mit der Sequenz Tyr-Asn-Leu-Gln-Pro-. Diese Sequenz findet sich in der Sequenz von Dotterprotein 2 von *Drosophila melanogaster* in den Positionen 162-166 (Abb.6.7.; Vitellogenin-2-Vorläufer, Hung und Wensink, 1982) und beginnt nach einem Argininrest, einem Rest an dem Trypsin C-terminal spaltet kann (siehe Abb.6.7.). Die Sequenz unterscheidet sich von einer homologen Sequenz in Dotterprotein 1 durch einen Prolinrest in Position 166 (Hovemann et al., 1982; Hung und Wensink, 1982).

Um das carboxyterminale Ende der Peptide zu bestimmen, wurde ihre Aminosäurezusammensetzung ermittelt (in Zusammenarbeit mit Dr. Lottspeich, Martinsried). Wie in Tab.6.3. gezeigt ist, hatte die Aminosäurezusammensetzung von Sulfopeptid A die höchste Übereinstimmung mit der Aminosäurezusammensetzung des Peptids mit der Sequenzposition 162-191. Der C-Terminus von Sulfopeptid A liegt somit in einer Sequenz mit zwei Arginin- und einem Lysinrest. Dies stellt eine s.g. überlappende tryptische

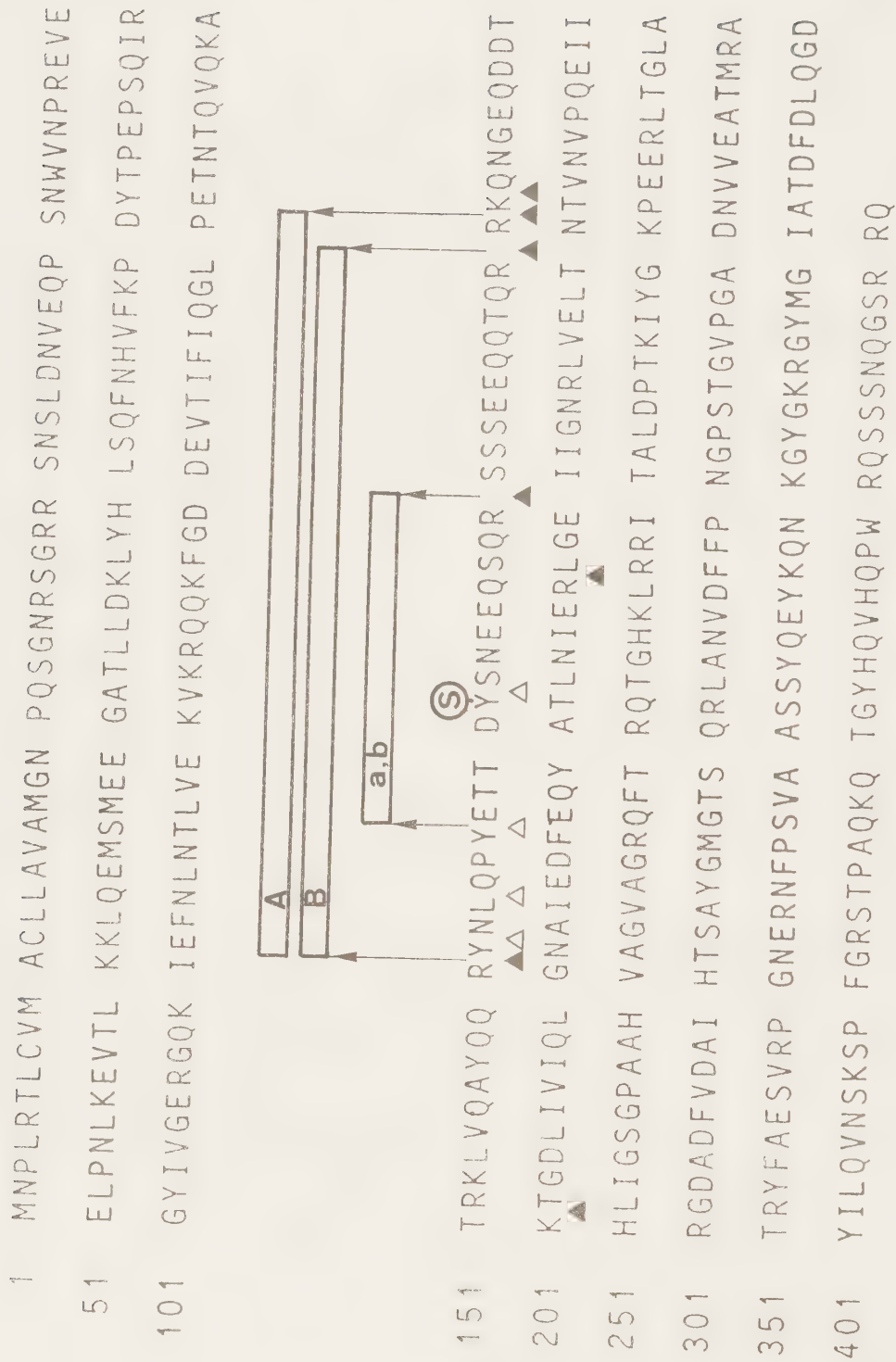


Abb. 6.7.: Primärstruktur des Dotterprotein-2-vorläufermoleküls. Die Sequenz wurde Hung und Wensink (1982) entnommen. Als Balken eingezeichnet sind die Sequenzpositionen der tryptischen Sulfopeptide A und B und des chymotryptisch-/tryptischen Sulfopeptides (a,b). Das S markiert den sulfatierten Tyrosinrest in Position 172. Die schwarzen Dreiecke markieren potentielle tryptische Spaltstellen und die offenen Dreiecke potentielle chymotryptische Spaltstellen.

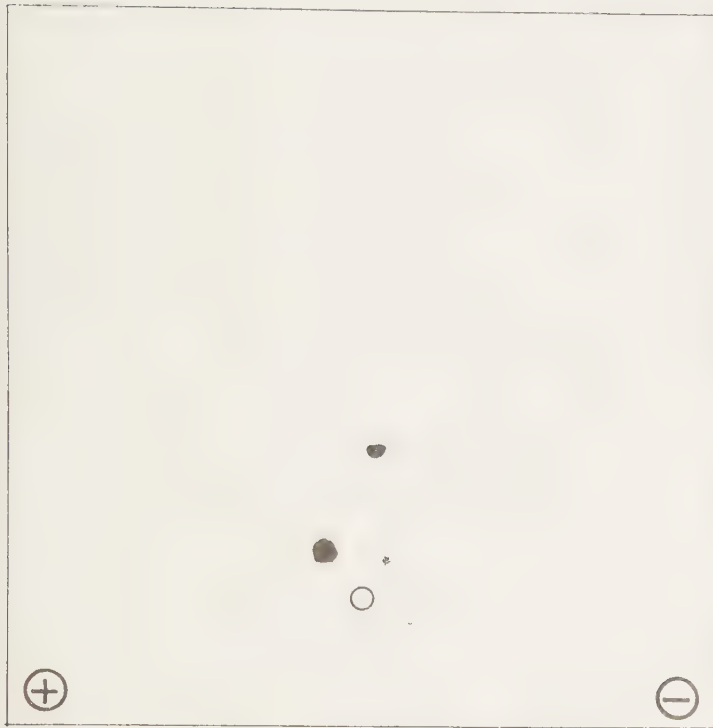
Spaltstelle dar. Da Trypsin C-terminale Arginin- oder Lysinreste nicht abspalten kann, können einmal entstandene Peptidspezies mit zwei C-terminalen basischen Resten nicht mehr weiter tryptisch abgebaut werden. Dies führt zur Entstehung mehrerer Peptide mit gleichem N-Terminus aber unterschiedlichem C-Terminus. Die Aminosäureanalyse von Sulfopeptid B war weniger aussagekräftig als die von A, da die Fraktion nicht homogen war (Abb.6.5.). Jedoch sprechen das ähnliche Elutionsverhalten bei HPLC (Abb.6.5.), die Verhältnisse einiger Aminosäuren zueinander ($\text{Asx:Glx} = 3,2:11,0$ oder $\text{Ser:Thr} = 5,0:2,7$) sowie die Abwesenheit bestimmter Aminosäuren (Lysin, Phenylalanin) in der Aminosäureanalyse (Tab.6.3.) dafür, daß es Sulfopeptid A sehr ähnlich war. Da die Fraktion von Sulfopeptid B wahrscheinlich noch ein anderes tryptisches Peptid enthielt (Abb.6.5.), das, wenn es nicht dem C-Terminus des Proteins entsprach, ebenfalls mindestens eine basische Aminosäure besaß (Arginin, da Lysin nicht nachweisbar; Tab.6.3.), hatte Sulfopeptid B wahrscheinlich nur 2 Argininreste. Mit einiger Wahrscheinlichkeit entspricht das Sulfopeptid B der Sequenzposition 162-190 und resultierte somit aus der überlappenden tryptischen Schnittstelle. Der Argininrest in Position 180 in den Sulfopeptiden A und B entging der Verdauung durch Trypsin.

Der Unterschied zwischen Sulfopeptid A und B resultierte nicht aus unterschiedlichen Sulfatierungsgraden der Peptide, da ihre Verhältnisse von (^{35}S)Radioaktivität zur Peakfläche

Mögliche tryptische Peptide mit dem N-Terminus Tyr 162-Asn-Leu-Gln-Pro							Aminosäureanalyse von Sulfopeptid A		Aminosäureanalyse von Sulfopeptid B	
	162-180	162-190	162-191	162-192	162-201	162-227	gefunden	Interpretation	gefunden	Interpretation
Ala	0	0	0	0	0	0	0,5	0	2,1	2
Arg	1	2	3	3	3	4	2,8	3	2,9	3
Asx	3	3	3	3	6	10	2,9	3	3,2	3
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Glx	6	11	11	11	14	19	11,0	11	11,0	11
Gly	0	0	0	0	1	3	1,2	a	11	a
His	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	4	0,3	0	1,2	1
Leu	1	1	1	1	1	4	1,6	1	4,3	4
Lys	0	0	0	1	2	4	0	0	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Pro	1	1	1	1	1	1	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Ser	2	5	5	5	5	5	4,7	5	5,9	6
Thr	2	3	3	3	4	6	3,0	3	3,2	3
Trp	0	0	0	0	0	0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
Tyr	3	3	3	3	3	4	3,0	3	3,6	4
Val	0	0	0	0	0	1	0	0	1,9	2

Tab.6.3.: Aminosäureanalysen der tryptischen Sulfopeptide A und B von Dotterprotein 2. Die durch HPLC isolierten tryptischen Sulfopeptide A und B (siehe Abb.6.5.) wurden in TFA/HCl hydrolysiert und die entstandenen Aminosäuren mit Orthophthalaldehyd (OPA) derivatisiert. Die derivatisierten Aminosäuren wurden durch HPLC getrennt und ihr Elutionsprofil durch Messung von Fluoreszenz aufgezeichnet. Die berechneten Aminosäurezusammensetzungen von sechs Peptiden von Dotterprotein 2 sind aufgeführt, die alle den gleichen (identifizierten) N-Terminus (Tyr 162) besitzen, aber C-terminal an verschiedenen potentiellen tryptischen Spaltstellen enden (berechnet aus der Sequenz an Hung und Wensink, 1982; siehe Abb.6.7.). Im Vergleich dazu sind die experimentell erhaltenen Aminosäureanalysen von Sulfopeptiden A und B ("gefunden") gezeigt, die berechnet wurden, in dem die Glx-Werte = 11 gesetzt wurden. Die Rundung der Ergebnisse ist als "Interpretation" bezeichnet. a: nicht berechnet. In den Duplikaten schwanken die Werte für Glycin erheblich. Wahrscheinlich entstammt Glycin dem Elektrophoreselaufpuffer. n.b.: mit der OPA-Methode nicht bestimmbar. Die Peptide, die am besten mit den Aminosäureanalysen von A bzw. B übereinstimmen, sind eingerahmt.

Kontrolle



alk. Phosphatase

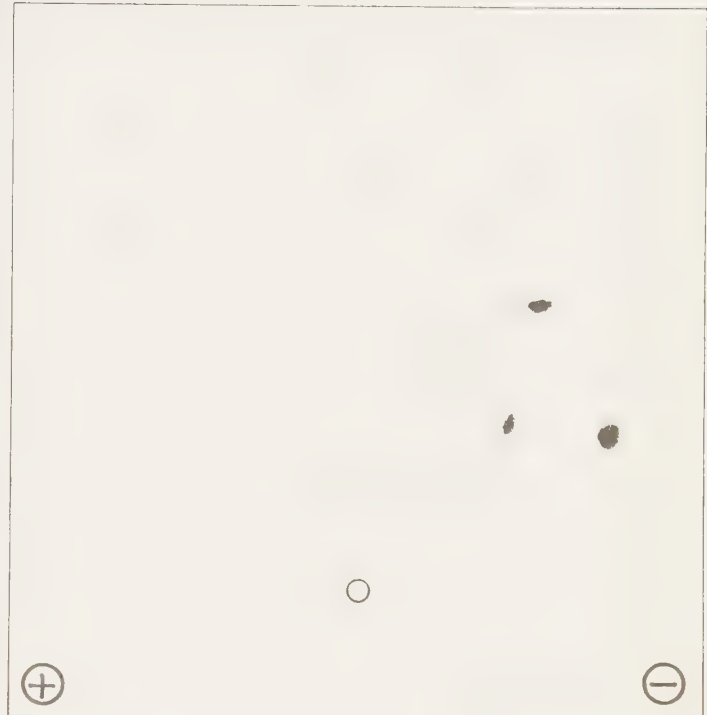


Abb.6.8. :: Behandlung der tryptischen Sulfopeptide von Dotterprotein 2 mit alkalischer Phosphatase.
 Tryptisch verdautes, sulfatmarkiertes Dotterprotein 2 wurde für 2 Stunden in der An- oder Abwesenheit von alkalischer Phosphatase inkubiert und die Proben anschließend durch Dünnschichtelektrophorese bei pH 3,5 (horizontale Dimension) und aufsteigende Chromatographie (vertikale Dimension) analysiert. Abgebildet sind Autoradiogramme der Cellulosedünnschichtplatten. Der Kreis markiert den Auftragungsort.

(206 nm) gleich waren. Es wurde die Möglichkeit überprüft, daß die Heterogenität der Sulfopeptide A und B durch unterschiedliche Grade von Phosphorylierung bedingt war, da bekannt ist, daß Dotterprotein 2 auch phosphoryliert ist (Brennan und Mahowald, 1982). Ein tryptischer Verdau von (^{35}S)Sulfat-markiertem Dotterprotein 2 wurde mit alkalischer Phosphatase behandelt. Nach zweidimensionaler Dünnschichtelektrophorese bewegten sich die mit Phosphatase behandelten Sulfopeptide bei pH 3,5 in Richtung Kathode, während die Peptide in der Kontrolle in der Nähe des Auftragungsortes blieben (Abb.6.8.). Dies war wahrscheinlich durch den Verlust von negativ geladenen Phosphatgruppen bedingt. Da sich die Sulfopeptide von Dotterprotein 2 durch eine Phosphatasebehandlung nicht in ein Sulfopeptid überführen ließen, ist es unwahrscheinlich, daß ihre Heterogenität auf unterschiedlichen Phosphatgehalten beruhte.

Wie der Abb.6.7. zu entnehmen ist, enthielten die Sulfopeptide A und B je drei Tyrosinreste. Daher wurde durch einen Subverdau mit Chymotrypsin versucht, aus den Sulfopeptiden A und B Sulfopeptide abzuspalten, die nur noch einen Tyrosinrest enthielten.

6.4. Nur der Tyrosinrest 172 in den beiden Sulfopeptiden A und B ist sulfatiert.

Unter den Standardbedingungen des tryptischen Verdau (in

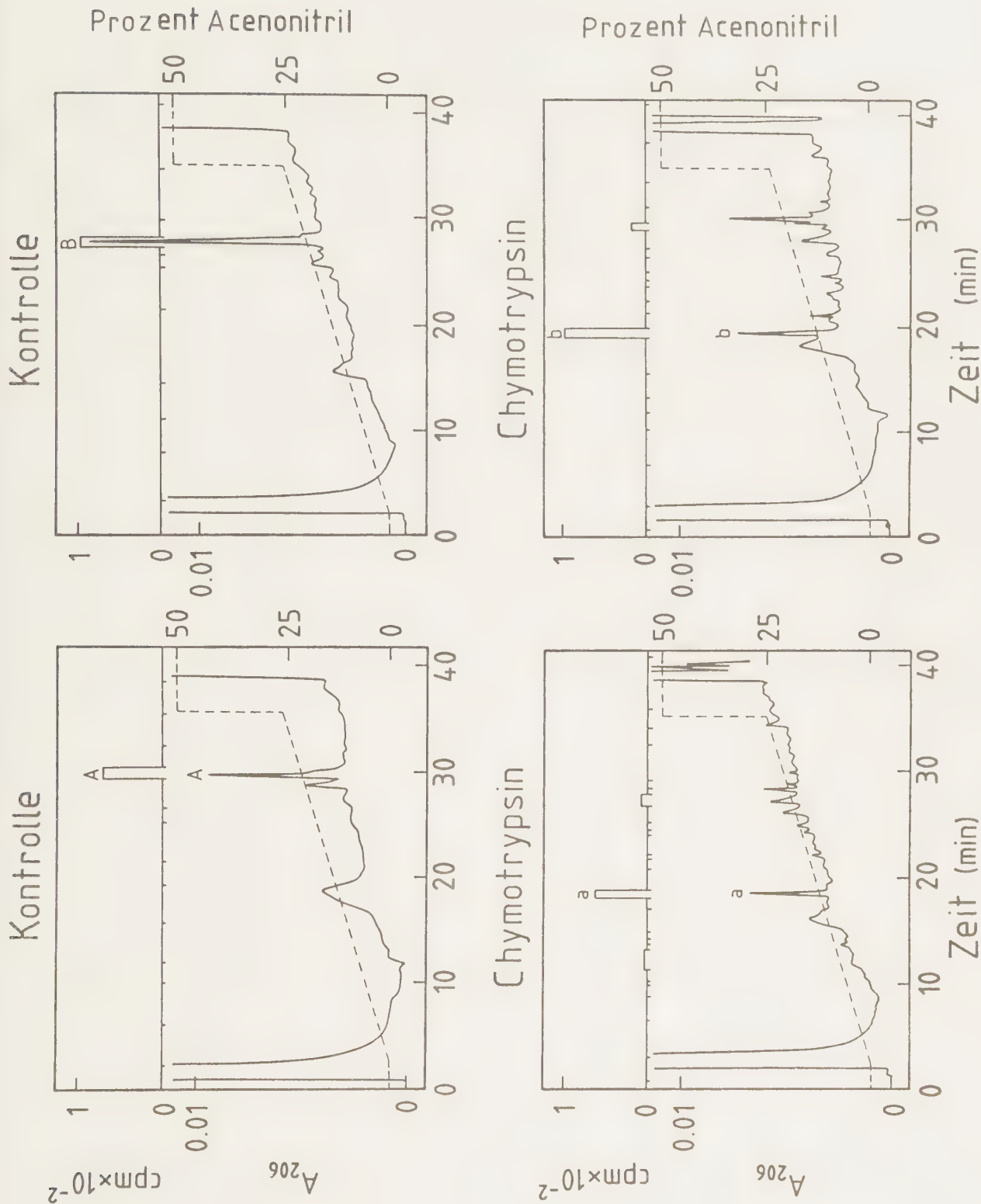


Abb.6.9.: Chymotryptischer Subverdan der tryptischen Sulfopeptide A und B. Die HPLC-gereinigten tryptischen Sulfopeptide A und B (siehe Abb.5.5.) wurden in der An- oder Abwesenheit von Chymotrypsin verdaut und durch HPLC analysiert. Für Details der Abbildung siehe Abb.6.5..

der Anwesenheit von 0,1 mM CaCl_2) konnte kein chymotryptischer Verdau der Peptide A und B erzielt werden. Erst in der Anwesenheit von 5 mM EDTA fand ein nahezu vollständiger Verdau der tryptischen Sulfopeptide statt. Die Produkte des chymotryptischen Verdaus der Sulfopeptide A und B wurden durch HPLC analysiert und die (^{35}S)Radioaktivität in Aliquoten der Fraktionen bestimmt (Abb.6.9.). Sowohl im chymotryptischen Verdau von Sulfopeptid A als auch dem von B wurde ein radioaktiver Peak mit Absorbtion bei 206 nm gefunden, der bei ca 10% Acetonitril von der Reverse-Phase-Säule eluiert wurde (Abb. 6.9., Chymotrypsin). In den Sulfopeptiden, mit a und b bezeichnet, wurde mehr als 85% der Radioaktivität wiedergefunden, die in A bzw. B enthalten war. Radioaktivität, die in den Positionen von A und B verblieb, konnte nach Wiederverdau mit Chymotrypsin vollständig in die Position von a bzw. b überführt werden (nicht abgebildet).

Sequentieller Edman-Abbau der ersten drei N-terminalen Aminosäuren der Sulfopeptide a und b (in Zusammenarbeit mit Dr. Lottspeich, Martinsried) ergab identische N-Termini mit der Sequenz Glu-Thr-Thr-, die der Sequenzposition 168-170 des Dotterproteins 2 entsprach (Hung und Wensink, 1982; siehe Abb.6.7.). Diese Sequenz kommt nicht in Dotterprotein 1 vor (Hovemann et al., 1982; Hung und Wensink, 1982). Die chymotryptische Spaltstelle in den Sulfopeptiden A und B lag C-terminal des Tyrosinrestes in Position 167 (siehe Abb.6.7.). Der Tyrosinrest 172 wurde von Chymotrypsin nicht

Mögliche chymotryptisch-/tryptischen Peptide mit dem N-Terminus Glu ¹⁶⁸ -Thr-Thr							Aminosäureanalyse	
	163-180	168-190	168-191	168-192	168-201	168-227	gefunden	Inter-pretation
Ala	0	0	0	0	0	2	0,2	0
Arg	1	2	3	3	5	4	1,5	1
Asx	2	2	2	2	5	10	2,0	2
Cys	0	0	0	0	0	0	0	0
Glx	5	10	10	10	13	19	5,0	5
Gly	0	0	0	0	1	3	0,4	0
His	0	0	0	0	0	0	0	0
Ile	0	0	0	0	0	4	0	0
Leu	0	0	0	0	0	4	0	0
Lys	0	0	0	1	2	2	0	0
Met	0	0	0	0	0	0	0	0
Phe	0	0	0	0	0	1	0	0
Pro	0	0	0	0	0	0	n.b.	n.b.
Ser	2	5	5	5	5	5	2,0	2
Thr	2	3	3	3	4	6	1,7	2
Trp	0	0	0	0	0	0	n.b.	n.b.
Tyr	1	1	1	1	1	2	0,5	1
Val	0	0	0	0	0	1	0	0

Tab.6.4.: Aminosäureanalyse des chymotryptisch-/tryptischen Sulfopeptides von Dotterprotein 2. (Details zur Methode siehe Tab.5.3. und Materialien und Methoden) Die berechneten Aminosäurezusammensetzungen von sechs Peptiden mit dem gleichen (identifizierten) N-Terminus (Glu 168) sind aufgeführt, die C-terminal an verschiedenen potentiellen tryptischen Spaltstellen enden (siehe Abb.5.9.). Gegenübergestellt ist die experimentell erhaltene Aminosäureanalyse des chymotryptisch-/tryptischen Sulfopeptides. Das analysierte Material entstammt nicht den Analysen aus Abb.6.9., sondern einer Wiederholung des Experiments, bei dem Sulfopeptid A und B zusammenverdaut wurden. n.b.: mit der Orthophthalaldehyd-Methode nicht bestimmbar. Das Peptid, das die beste Übereinstimmung mit der Aminosäureanalyse zeigte ist eingerahmt.

erkannt. Es ist beobachtet worden, daß phosphorylierte oder sulfatierte Tyrosinreste nicht von Chymotrypsin erkannt werden (siehe z.B. Gregory et al., 1964). Nach chymotryptischem Verdau einer Mischung von Sulfopeptid A und B wurde nur ein Sulfopeptid erhalten (nicht abgebildet). Dies zeigt, daß die Sulfopeptide a und b identisch waren. Die Aminosäurezusammensetzung des chymotryptisch-tryptischen Sulfopeptids (a,b) ergab eine gute Übereinstimmung mit der, die für das Peptid mit der Sequenzposition 168-180 berechnet wurde (Tab.6.4.). Offensichtlich wurden der Tyrosinrest in Position 167 und der Argininrest in Position 180 erst nach Zugabe eines Chelators divalenter Kationen für eine Spaltung durch Chymotrypsin bzw. eine Trypsinverunreinigung zugänglich.

Wie der Sequenz in Abb.6.7. zu entnehmen ist, enthält das chymotryptisch-tryptische Sulfopeptid nur noch einen Tyrosinrest. Da es praktisch alle ^{35}S -Radioaktivität enthielt, die ursprünglich in den tryptischen Sulfopeptiden A und B enthalten war, ist der Tyrosinrest 172 in der Sequenz ETTDYSNEE der einzige sulfatierte Tyrosinrest in Dotterprotein 2 von *Drosophila melanogaster*.

DISKUSSION

6.1. Reinigung der Dotterproteine

Die Dotterproteine 1, 2 und 3 von *Drosophila melanogaster* wurden erstmals von Warren und Mahowald (1979) aus Embryonen gereinigt, wo sie ca 80% des gesamten Proteins darstellen.

Aus den folgenden Gründen waren Dotterproteine aus Embryonen jedoch keine geeignete Quelle, um Sulfopeptide zu isolieren:

1. Die Charakterisierung der Tyrosinsulfatierung der Dotterproteine wurde ausschließlich mit in vivo markierten Fliegen durchgeführt (siehe Kapitel 4). Es ist nicht bekannt, ob die Dotterproteine in Embryonen noch sulfatiert vorliegen.

2. Nur in ausgewachsenen, weiblichen Fliegen, die die Dotterproteine synthetisieren, können die Dotterproteine mit (^{35}S)Sulfat markiert werden. Die Sulfatmarkierung ist notwendig, um Sulfopeptide zu identifizieren.

In ausgewachsenen, weiblichen Fliegen finden sich die Dotterproteine (1) in den sie produzierenden Fettkörper- und Follikelzellen, von wo sie ohne eine Speicherungsphase sekretiert werden, (2) in der Hämolymphe, wo sie als s.g. Vitellogenine zirkulieren und (3) in Oozyten, wohin sie durch Endocytose aus der Hämolymphe gelangen (siehe Mahowald und Kambyzellis, 1982). Der Großteil der Dotterproteine in weiblichen Fliegen kommt in den Eiern vor, die einen Großteil des Hinterleibes ausfüllen. Wie aus dem

Reinigungsfaktor von 27, der Reinheit der Fraktion von 80% und der Annahme, daß im Ausgangsmaterial 50% Gewichtsprozent weibliche Fliegen waren, berechnet wurde, stellten die drei Dotterproteine ca 6% der gesamten Proteine in weiblichen Fliegen dar.

Die Beobachtung, daß die Dotterproteine nur in Puffern mit hoher Ionenstärke löslich sind (Warren und Mahowald, 1979), konnte bei der hier erstmals beschriebenen Reinigung der Dotterproteine aus Fliegen für einen effizienten Reinigungsschritt verwendet werden. In nur wenigen Schritten, ohne Verwendung von Säulenchromatographie, konnten die drei Dotterproteine mit einer durchschnittlichen Ausbeute von 31% gereinigt werden.

6.2. Identifizierung der Tyrosinsulfatierungsstelle in Dotterprotein 2

Der experimentelle Ansatz, mit dem die Tyrosinsulfatierungsstelle in Dotterprotein 2 identifiziert wurde, unterscheidet sich von dem zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in Proteinen. Zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen werden (^{32}P)Phosphopeptide aus einem Protein isoliert und durch N-terminale Sequenzierung identifiziert. Das Phosphopeptid wird bis zu Ende sequenziert und dabei in jedem Abbauzyklus die ^{32}P -Radioaktivität bestimmt. Dies ergibt sowohl die Sequenzposition der Phosphatgruppe, als auch die Aminosäure,

an der die Phosphatgruppe gebunden war. Da Tyrosinsulfat unter den stark sauren Bedingungen, die bei der N-terminalen Sequenzierung auftreten, instabil ist (siehe auch Hortin et al., 1986), konnte dieser methodische Ansatz nicht gewählt werden. Bei Dotterprotein 2 wurde deshalb versucht, Sulfopeptide zu isolieren, die nur einen Tyrosinrest enthielten. Sulfopeptide wurden durch N-terminale Sequenzierung identifiziert und ihre Länge aus der Aminosäurezusammensetzung ermittelt. Enthält ein Sulfopeptid mehr als einen Tyrosinrest, muß es mit einer anderen Protease subverdaut werden und die resultierenden Sulfopeptide wiederum isoliert und identifiziert werden, bis feststeht, daß ein Sulfopeptid nur noch einen Tyrosinrest enthält.

Nach Reinigung von Dotterprotein 2 durch zweidimensionale Gelelektrophorese wurden Sulfopeptide durch direkte Behandlung der Gelstücke mit Trypsinlösung vollständig eluiert. Das Eluat konnte nach Vorreinigung auf einer C₁₈-Säule direkt durch HPLC analysiert werden. Von der Radioaktivität, die aus den Gelstücken eluiert wurde, konnten 51-56% in zwei Sulfopeptiden wiedergefunden werden. Folgende Beobachtungen sprechen dagegen, daß während der Reinigung eine Dotterproteinspezies spezifisch verloren ging, die unterschiedliche Sulfopeptide und damit andere Tyrosinsulfatierungsstellen besaß, als die gereinigten Dotterproteine.

1. Während der Reinigung der Dotterproteine aus Fliegen

trat keine Desulfatierung auf.

2. Sulfatmarkiertes Material aus den tryptischen Eluaten ging schrittweise während der Präparation verloren. Die Verluste, die bei den einzelnen Reinigungsschritten auftraten (siehe Tab.6.2.), lassen sich dadurch erklären, daß ein gewisser Prozentsatz des markierten Materials an Säulenmaterial, Plastikgefäße, Stahlkanülen der HPLC-Anlage etc. absorbiert wurde und dadurch verloren ging. So finden sich z.B. nach Rechromatographie einzelner Sulfopeptide durch HPLC nur 70-80% der spezifischen ^{35}S -Radioaktivität wieder.

3. Die Auffindung von nur zwei Sulfopeptiden für das Dotterprotein 2 nach HPLC deckt sich mit dem Ergebnis der Sulfopeptidkartierung, wo gleichfalls nur zwei Sulfopeptide bei Dotterprotein 2 gefunden wurden (siehe Kapitel 5; Abb.5.7.). Bei der Sulfopeptidkartierung auf Dünnschichtcelluloseplatten sollte im Gegensatz zu HPLC-Untersuchungen alle aufgetragene ^{35}S -Radioaktivität auffindbar sein.

Die zwei tryptischen Sulfopeptide von Dotterprotein 2, die den Sequenzpositionen 162-191 und (vermutlich) 162-190 entsprachen, konnten nur in der Anwesenheit eines Chelators divalenter Kationen durch Chymotrypsin subverdaut werden. Dabei fand auch ein weiterer tryptischer Subverdau der Sulfopeptide an Arginin 180 statt, der in der Anwesenheit von 0,1 mM CaCl_2 nicht beobachtet wurde. Es ist möglich, daß die Sulfopeptide mit divalenten Kationen komplexiert

vorlagen, was zu einer Maskierung der potentiellen tryptischen und chymotryptischen Schnittstellen in den Peptiden führe. In den Calciumbindestellen des Proteins Calmodulin (siehe Klee et al., 1980) werden Calciumionen ausschließlich über Aminosäuren mit Carboxy-, Hydroxy- und Amidofunktionen komplexiert. Da die tryptischen Sulfopeptide von Dotterprotein 2 nahezu ausschließlich aus solchen Aminosäuren bestehen, ist anzunehmen, daß die Domäne in Dotterprotein 2, der die Sulfopeptide entstammen, Calciumbindeeeigenschaften besitzt.

6.3. Expression von Dotterprotein 2 in L-Zellen der Maus

Damit der Effekt einer gerichteten Mutagenese des Tyrosin 172 in Dotterprotein 2 studiert werden kann, mußte zunächst ein Zellkultursystem etabliert werden, in dem mutiertes und unmutiertes Dotterprotein 2 durch Markierungsversuche untersucht werden können. Dr. Evelyne Friederich aus unserem Labor gelang die Expression des Gens von Dotterprotein 2 nach Transfektion in L-Zellen der Maus (siehe Huttner et al., 1986). Das Fliegenprotein wurde in dem heterologen System der L-Zellen in das Medium sekretiert und war gleichfalls stöchiometrisch an Tyrosin 172 sulfatiert. Dies zeigt, daß die Konsensusstruktur der Tyrosinsulfatierung hoch konserviert ist.

6.4. Gerichtete Mutagenese von Dotterprotein 2

Dr. Evelyne Friederich mutierte das Tyrosin 172 in Dotterprotein 2 zu einem Phenylalaninrest (in Zusammenarbeit mit Dr. Fritz, Martinsried) und exprimierte gleichfalls das Gen des mutierten Dotterprotein 2 in L-Zellen. Das mutierte Dotterprotein 2, das in das Medium sekretiert wurde, konnte in intakten Zellen nicht mehr mit (^{35}S)Sulfat an Tyrosinresten sulfatiert werden. Dies bestätigte, daß Tyrosin 172 der einzige in vivo sulfatierbare Tyrosinrest in Dotterprotein 2 war. Die Effekte der Mutation auf die Kinetik und die mögliche Polarität der Sekretion werden zur Zeit von Dr. Friederich im Detail untersucht.

Für die Untersuchungen, die hier beschrieben sind, wurden Antiseren und affinitätsgereinigte Antikörper gegen Dotterprotein 2 benötigt. Deren Herstellung und Charakterisierung ist im Anhang dieser Arbeit beschrieben.

K A P I T E L 7

CHLORAT - EIN INHIBITOR DER PROTEINSULFATIERUNG
IN INTAKTEN ZELLEN

EINFÜHRUNG

Da die gerichtete Mutagenese von Proteinen relativ aufwendig und nur für Proteine anwendbar ist, deren DNA bereits kloniert wurde, wurde nach einer anderen Möglichkeit gesucht, die Funktion der Tyrosinsulfatierung in intakten Zellen zu untersuchen. Dabei wurde an einen pharmakologischen Ansatz gedacht. Der Einsatz eines spezifischen Inhibitors der Tyrosinsulfatierung würde es ermöglichen, funktionelle Aspekte der Tyrosinsulfatierung auch in Proteinen zu untersuchen, die noch nicht so gut charakterisiert sind. Ein solcher Inhibitor könnte folgende Angriffsorte in der Zelle haben, um die Tyrosinsulfatierung bzw. jegliche Art der Proteinsulfatierung zu hemmen (vgl. Abb.7.1.):

(1) Das PAPS-synthetisierende System

Dieses besteht aus den zwei Enzymen ATP-Sulfurylase und APS-Kinase und ist im Cytosol lokalisiert (siehe Mulder, 1981a; Abb.7.1.). Aktiviertes Sulfat, PAPS (Struktur siehe Abb.E4), dient als universelles Kosubstrat für alle

bekannten Sulfatierungsreaktionen (siehe Mulder, 1982). Eine Hemmung seiner Synthese durch Hemmung eines der beteiligten Enzyme würde sowohl die Tyrosinsulfatierung als auch die Kohlenhydratsulfatierung in Polypeptiden blockieren. In vitro-Experimente mit der gereinigten ATP-Sulfurylase von *Penicillium chrysogenum* (Farley et al., 1978) und der aus Rattenleber (Burnell und Roy, 1978) haben gezeigt, daß sulfatanaloge Anionen, wie z.B. Selenat oder Molybdat, als kompetitive Inhibitoren der ATP-Sulfurylasereaktion wirken können. Selenat wurde kürzlich als Inhibitor der Sulfatierung bei Zellen von *Dictyostelium* verwendet (Davies und Wheldrake, 1985). Es erwies sich jedoch als toxisch (Peter Hohmann, Martinsried, persönliche Mitteilung).

(2) Das PAPS-translozierende System

Die Proteinkomponenten, die PAPS vom Cytosol, dem Ort seiner Synthese, in das Lumen des trans Golgi Apparates, dem Ort seiner Verwendung, transportieren, sind bislang noch nicht identifiziert worden. Es könnte sich bei ihnen entweder um eigenständige Nukleotidtransportproteine (analog dem ATP/ATP-Carrier der Mitochondrien) handeln oder um einen intrinsischen Teil der Sulfotransferasen. Nach einer Studie von Schwarz et al. (1984) scheint es sich bei dem Translokationsprozess von PAPS in Golgivesikel um einen sättigbaren, temperaturabhängigen Vorgang zu handeln, bei dem PAPS mit AMP (wahrscheinlich 3'-AMP) im Antiport

Sulfataktivierung

PAPS-Translokation

Sulfatierung

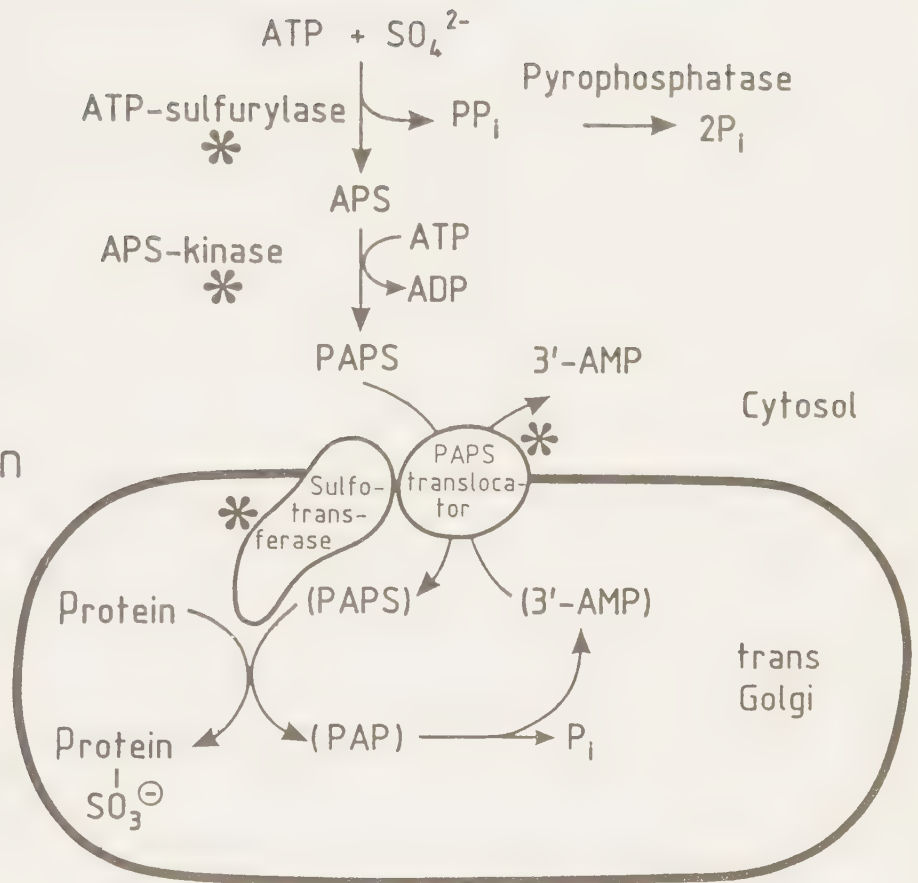


Abb.7.1.: Synthese von PAPS, seine Translokation in den Golgi und seine Teilnahme an der Sulfatierung von Proteinen im Golgi.

Die Abbauprodukte von PAPS im trans Golgi sind hypothetisch und daher in Klammern. Möglicherweise kann PAPS im trans Golgi Lumen nicht frei diffundieren (Schwarz et al., 1982). Potentielle Angriffsorte für Inhibitoren der Proteinsulfatierung sind mit einem Stern markiert.

ausgetauscht wird und der durch Behandlung der Vesikel mit Pronase irreversibel gehemmt wird. In Abb.7.1. ist der Translokationsprozess schematisch dargestellt.

(3) Das Sulfotransferase System

Ein Inhibitor, der ausschließlich die Tyrosylproteinsulfotransferase inhibiert, wäre das denkbar spezifische Werkzeug, um die Funktion der Tyrosinsulfatierung zu studieren. Die Substanzen Dichlornitrophenol und Pentachlorphenol sind kürzlich als in vivo-Inhibitoren von Phenolsulfotransferasen (Meermann et al., 1983), die u.a. Entgiftungsfunktionen in der Leber haben, beschrieben worden. Diese Substanzen bieten sich an, in Zellkulturen auf ihren Einfluß auf die Proteinsulfatierung untersucht zu werden.

Im folgenden Kapitel werden verschiedene potentielle Inhibitoren der Proteinsulfatierung mit potentiellen Angriffspunkten auf der Ebene der Kosubstratsynthese und des Enzyms in Zellkulturen untersucht.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Substanzen Natriumselenat, Natriumwolframat, Natriumthiosulfat, Natriumfluorosulfonat, Natriummolybdat, Natriumchlorat, Natriumperchlorat, Natriumnitrat, Dichlornitrophenol (DCNP) und Pentachlorphenol (PCP) wurden in den Hybridomazellkulturen M31 und 81-04 auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die Inkorporation von (^{35}S)Sulfat und (^3H)Tyrosin in Proteine zu inhibieren. Nach Markierung der Zellkulturen in der An- oder Abwesenheit von 1 mM bzw. 0,1 mM Testsubstanz wurden zelluläre Proteine durch SDS-PAGE analysiert. Von den Proteinen der Molekulargewichtsregion >97 kDa wurde das Verhältnis von eingebauter ^{35}S - zu ^3H -Radioaktivität bestimmt. Bei diesem Test zeigten die Substanzen Natriumfluorosulfonat, Natriumselenat, Natriumthiosulfat, Natriumchlorat, DCNP und PCP die stärksten Effekte auf das ^{35}S : ^3H -Verhältnis. Natriumselenat, PCP und DCNP wiesen jedoch gegenüber der Kontrolle eine deutliche Verminderung des Tyrosineinbaus sowie eine Veränderung des Proteinmusters auf und wurden aufgrund dieser cytopathischen Effekte nicht weiter untersucht. Bei Natriumfluorosulfonat und Natriumthiosulfat konnte nicht ausgeschlossen werden, daß der reduzierte Einbau von (^{35}S)Sulfat (z.T.) von unmarkierten Sulfationen herrührt, die aus Thiosulfat und Fluorosulfonat entstehen können, und die die spezifische Aktivität des radioaktiven Sulfats absenken würden. Aus diesen Gründen wurde nur noch

der Effekt von Natriumchlorat eingehender charakterisiert.

Die sulfatierungshemmende Wirkung von Chlorat wurde in PC12-Zellen untersucht, da diese Zellen zwei gut untersuchte tyrosinsulfatierte Proteine, Secretogranin I und II, produzieren und intrazellulär in sekretorischen Granula speichern (Rosa et al., 1985a). Chlorat zeigte selbst bei 50 mM Konzentration im Medium nur eine 30%-ige Hemmung des Einbaus von (^3H)Tyrosin bei nahezu vollständiger Hemmung der (^{35}S)Sulfatinkorporation in zelluläre Proteine. Wenn das Verhältnis von inkorporiertem (^3H)Tyrosinsulfat zu (^3H)Tyrosin nach alkalischer Hydrolyse der Proteine bestimmt wurde, hemmte Chlorat die Tyrosinsulfatierung der Secretogranine I und II in intakten Zellen in einer dosisabhängigen Weise. Der verminderte Einbau von (^{35}S)Sulfat in die Secretogranine verlief dabei in seiner Dosisabhängigkeit von Chlorat parallel zur Verminderung des (^3H)Tyrosinsulfat/ (^3H)Tyrosin-Verhältnisses. Die Chloratkonzentration, bei der sowohl 50% der (^{35}S)Sulfatinkorporation als auch 50% der durch (^3H)Tyrosinsulfat gemessenen Tyrosinsulfatierung gehemmt wurde, betrug 1 mM.

In Vorversuchen wurde gezeigt, daß Methionin und Cystein im Medium die intrazelluläre Sulfatkonzentration beeinflussen. Eine Verminderung der Konzentration von Methionin und Cystein führte zu einer erhöhten radioaktiven Markierung von Proteinen nach (^{35}S)Sulfatmarkierung, was auf eine Verminderung der intrazellulären Konzentration an

unmarkiertem Sulfat hindeutet. Wenn die Tyrosinsulfatierung der Secretogranine unter diesen Bedingungen untersucht wurde, war der inhibierende Effekt von Chlorat stark potenziert, sodaß bereits bei 1 mM Chlorat die Tyrosinsulfatierung zu mehr als 97% gehemmt war.

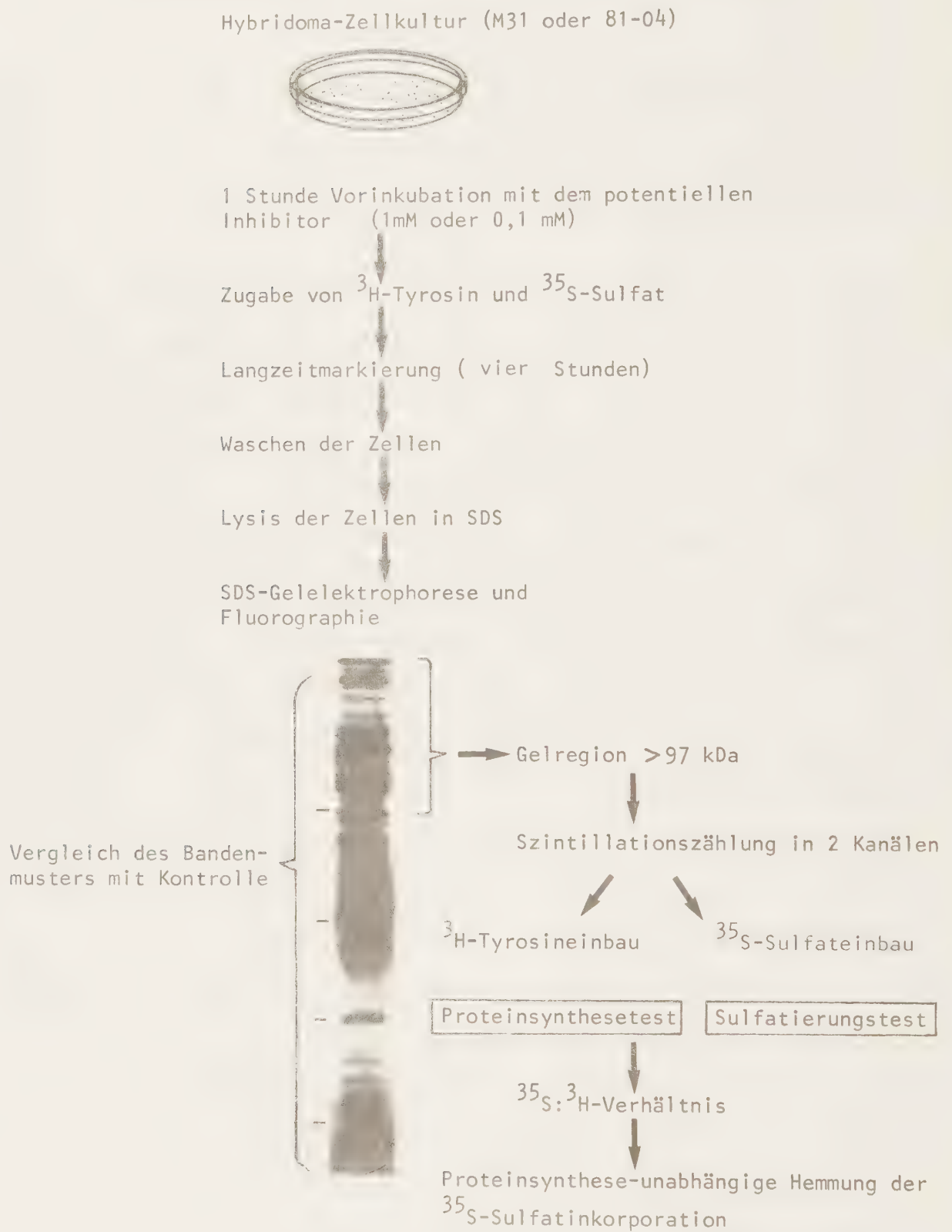
Die Verwendung von Chlorat unter Bedingungen, bei denen die intrazelluläre Sulfatkonzentration reduziert wird, eröffnet die Möglichkeit sowohl die Funktionen der Tyrosinsulfatierung als auch die der Kohlenhydratsulfatierung von Proteinen in Zellkulturen zu studieren. Es ermöglicht weiterhin, unsulfatierte Proteine in Zellkulturen zu synthetisieren, um z.b. deren Schicksal im Organismus zu untersuchen.

ERGEBNISSE

7.1. Sulfatanaloge Anionen blockieren in vivo die Inkorporation von (^{35}S)Sulfat in Proteine von Hybridomazellen.

Sieben Natriumsalze von Anionen, die strukturell dem Sulfation ähnlich sind, wurden in 1 mM Konzentration in Hybridomazellkulturen auf ihre Fähigkeit getestet, den Einbau von radioaktivem Sulfat in Proteine (und Proteoglykane) zu hemmen (siehe Schema 6.1.). Gleichzeitig wurde untersucht, ob die Substanzen den Einbau von (^3H)Tyrosin in Proteine hemmen. Da Proteinsulfatierung (zumindest an Tyrosin) irreversibel ist (siehe Einleitung), ist sie von einer kontinuierlichen Synthese des Proteinsubstrates abhängig. Daher kann z.B. der Proteinsynthesehemmer Cycloheximid eine scheinbare Hemmung der Sulfatierung bewirken (Huttner und Lee, 1982), die aber nur darauf beruht, daß kein sulfatierbares Proteinsubstrat mehr produziert wird. Der Quotient aus ^{35}S - und ^3H -Radioaktivität wurde als proteinsyntheseunabhängige Sulfatierungsgröße berechnet (Tab.7.1., letzte Spalte). Verglichen mit der Kontrolle zeigten alle sieben Substanzen eine mehr oder weniger starke Verminderung des $^{35}\text{S}:^3\text{H}$ -Quotienten in der Reihenfolge $\text{FSO}_3^- > \text{SSO}_3^{2-} > \text{SeO}_4^{2-} > \text{ClO}_3^- > \text{WO}_4^{2-} > \text{ClO}_4^- > \text{MoO}_3^- > \text{NaNO}_3$ (Tab.7.1.).

Selenat inhibierte den Tyrosineinbau in Proteine um 50%

TESTSCHEMA FÜR POTENTIELLE PROTEINSULFATIERUNGSCHEMME

(Tab.7.1.) und zeigte ein leicht verändertes Proteinbandenmuster (nicht abgebildet). Aufgrund dieser cytopathischen Erscheinungen wurde die Anwendbarkeit von Selenat nicht eingehender untersucht. Abgesehen von Fluorosulfonat und Natriumnitrat, die den Tyrosineinbau um ca 30% inhibierten, hatten die restlichen sulfat-analogen Anionen keinen signifikanten Einfluß auf die Proteinsynthese (Tab.7.1.).

Fluorosulfonat und Thiosulfat zeigten die stärkste Hemmung der (^{35}S)Sulfatinkorporation in Proteine intakter Zellen. Bei beiden Substanzen kann jedoch freies, unmarkiertes Sulfat entstehen. Im Falle von Thiosulfat durch mitochondriale Enzyme (Bartholomev et al., 1980) und im Falle von Fluorosulfonat durch Hydrolyse. Die Absenkung der spezifischen Aktivität des radioaktiven Sulfates durch eine Mischung mit unmarkiertem Sulfat kann eine Hemmung des (^{35}S)Sulfateinbaus in Proteine vortäuschen. Auf Grund dieser Möglichkeit wurden Fluorosulfonat und Thiosulfat nicht eingehender untersucht, obgleich sie auch eine echte hemmende Wirkung haben könnten.

Chlorat, das bei einer Konzentration von 1 mM die Sulfatinkorporation um ca 50% hemmte (Tab.7.1.), wurde eingehender untersucht, da es ebenfalls ein wirkungsvoller Inhibitor der radioaktiven Sulfatinkorporation war aber nicht die Probleme wie Selenat, Fluorosulfonat und Thiosulfat aufwarf.

Substanz	geteste Konzentration	Einbau von ^3H -Tyrosin	Einbau von ^{35}S -Sulfat	Verhältnis von $^{35}\text{S} : ^3\text{H}$
	(mM)	(Prozent der Kontrolle)	(Prozent der Kontrolle)	(Prozent der Kontrolle)
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	1	106	38	36 ^b
Na_2SeO_4	1	50	23	47 ^a
NaFSO_3	1	81	10	13 ^b
NaClO_4	1	100	79	79 ^b
NaClO_3	1	99 98	53 40	54 ^a 41 ^b
NaMoO_3	1	100	87	87 ^a
Na_2WO_4	1	98	73	74 ^a
NaNO_3	1	79	81	97 ^a
Dichlorphenol- Nitrophenol	0,1	45	18	40 ^a
Pentachlorphenol	0,1	1,3	1	(54) ^a

a : 81-04 Zellen ; b : M 31 Zellen

Tab.7.1.: Test potentieller Inhibitoren der Tyrosinsulfatierung von Proteinen.
Die aufgelisteten Substanzen wurden, wie in Schema 7.1. gezeigt, in Zellkultur untersucht.

Dichlornitrophenol und Pentachlorphenol, die in vivo in Ratten injiziert angeblich die Tyrosinsulfatierung von Cholecystokinin im Hirn hemmen (Giorgi und Meek, 1984), erwiesen sich in Zellkultur in 0,1 mM Konzentration als starke Hemmer der Proteinsynthese und damit als cytotoxisch (Tab.7.1.). Wenn die Substanzen bei weniger toxischen Konzentrationen (DCNP 50 μ M; PCP 5 μ M) untersucht wurden, kam es zu keiner wirkungsvollen Hemmung der radioaktiven Sulfatinkorporation (nicht abgebildet).

7.2. Chlorat ist von geringer Toxizität.

Wie Beobachtungen mit dem Phasenkontrastmikroskop zeigten, veränderte sich selbst nach 48-stündiger Kultivierung in der Anwesenheit von 20 mM Chlorat die morphologische Erscheinung von Zellen und ihr Wachstum nicht auffallend im Vergleich zu Kontrollzellen (nicht abgebildet). In PC12- Zellkulturen wurde Chlorat bis zu einer Konzentration von 50 mM im Medium (siehe Kapitel 7.5. und 7.6.) getestet. Wie in Abb.7.2. durch SDS-PAGE und Fluorographie gezeigt ist, war in der Anwesenheit von 5 mM Chlorat die Inkorporation von radioaktivem Tyrosin in Proteine nicht signifikant reduziert oder das Muster der markierten Proteine verändert. In der Anwesenheit 50 mM Chlorat war der Einbau von radioaktivem Tyrosin zu ca 30% gehemmt (Abb.7.2.). Der Effekt des Chlorats auf den Tyrosineinbau kann bei dieser Konzentration (100 mOsmol) durch osmotischem Stress bedingt gewesen sein.

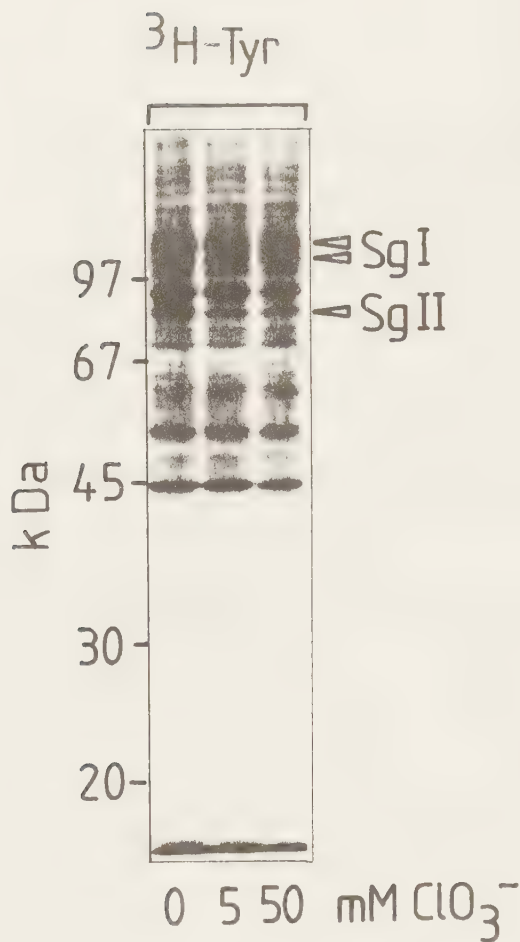


Abb.7.2.: Der Einfluß von Chlorat auf den Einbau (^3H)Tyrosin in Proteine von PC12-Zellen.

PC12-Zellen wurden mit (^3H)Tyrosin bei den angegebenen Konzentrationen von Chlorat im Medium markiert und die gesamten zellulären Proteine anschließend auf reduzierenden 10% SDS-Gelen analysiert. Ein Fluorogramm des Geles ist gezeigt. Die Positionen von Molekulargewichtstandards und die von Secretogranin I und II (Rosa et al., 1985a,b) sowie die Konzentrationen von Chlorat im Zellkulturmedium sind angezeigt. Die Konzentrationen von Methionin und Cystein im Medium waren auf 1% reduziert (siehe Abb.7.6.).

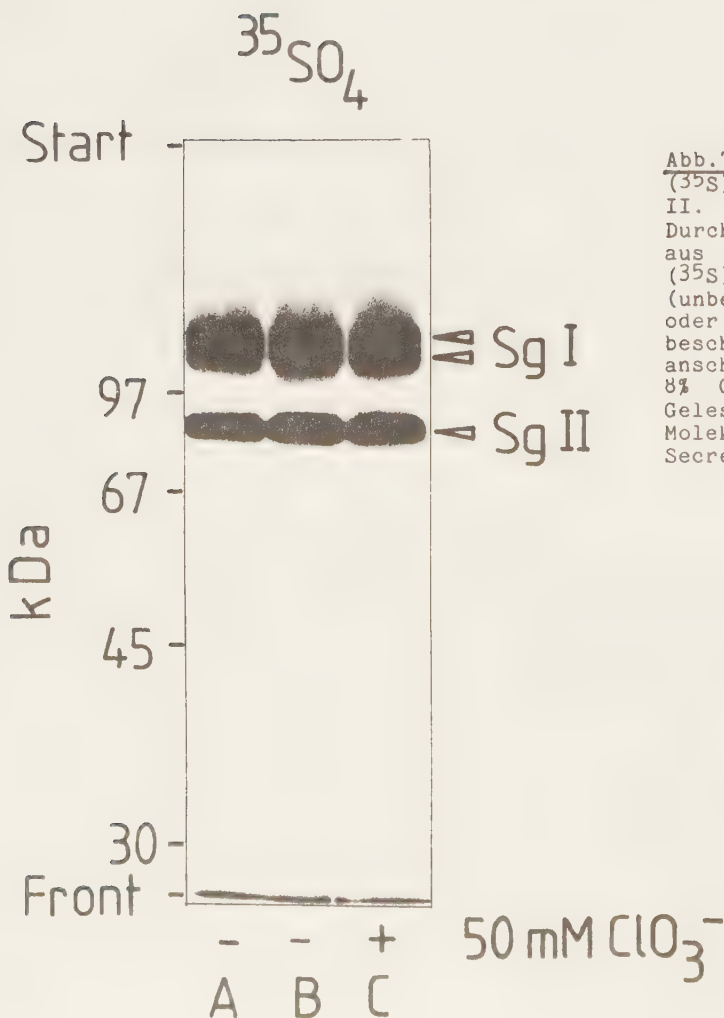


Abb.7.3.: Der Einfluß von Chlorat auf (^{35}S)Sulfat-markierte Secretogranine I und II.

Durch einen Hitzeschritt (Rosa et al., 1985b) aus PC12-Zellysaten gereinigte (^{35}S)Sulfat-markierte Secretogranine I und II (unbehandelt: A) wurden in der Ab- (-)(B) oder Anwesenheit (+)(C) von 50 mM Chlorat wie beschrieben inkubiert. Die Proben wurden anschließend durch reduzierende SDS-PAGE auf 8% Gelen analysiert. Ein Fluorogramm des Geles ist abgebildet. Die Positionen von Molekulargewichtstandards und die der Secretogranine I und II sind angezeigt.

7.3. Chlorat selbst hat keine desulfatierende Aktivität.

Partiell aus PC12-Zellen gereinigte (^{35}S)Sulfat-markierte Secretogranine I und II (Rosa et al., 1985b) wurden für 18 Stunden in der An- (Abb.7.3., C) oder Abwesenheit (Abb.7.3., B) von 50 mM Chlorat in DMEM inkubiert. Nach Kochen in Lämmli's Probenpuffer wurden die Proben durch SDS-PAGE analysiert. Wie in der Fluorographie in Abb.7.3. (C) gezeigt ist, war kein Verlust von (^{35}S)Sulfatmarkierung in den Secretograninen I und II nach Behandlung mit Chlorat feststellbar. Dies schließt aus, daß der hemmende Effekt von Chlorat auf die Sulfatinkorporation aus einer chemischen Desulfatierung der Proteine resultierte.

7.4. Chlorat senkt das Verhältnis von (^3H)Tyrosinsulfat zu (^3H)Tyrosin in den Secretograninen I und II.

Um auszuschließen, daß der hemmende Effekt von Chlorat auf die Sulfatierung von Proteinen ein Artefakt war, der z.B. nur die spezifische Aktivität des radioaktiven Sulfates beeinflusste, wurde nach einer alternativen Methode gesucht, die nicht auf der Inkorporation von radioaktivem Sulfat beruhte. Wie in Kapitel 2 und 5 gezeigt ist, kann die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung nach alkalischer Hydrolyse von mit (^{14}C)- oder (^3H)Tyrosin-markiertem Protein bestimmt werden. Aus diesem Grunde wurden PC12-Zellen mit (^3H)Tyrosin bei verschiedenen Chloratkonzentrationen

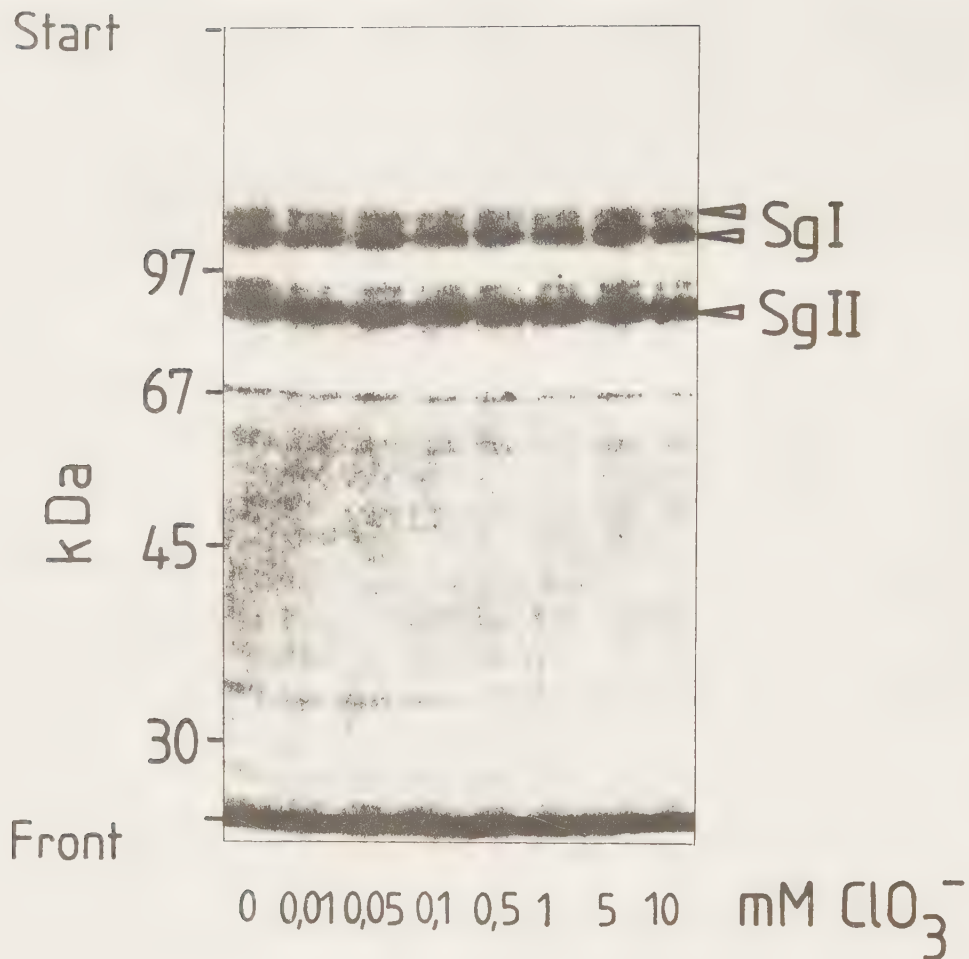


Abb.7.4.: Partielle Reinigung [^3H]Tyrosin-markierter Secretogranine I und II aus chloratbehandelten PC12-Zellen. Nach Markierung von PC12-Zellen mit [^3H]Tyrosin unter den angegebenen Konzentrationen von Chlorat im Medium wurden die Zellen lysiert und die Secretogranine durch Hitzebehandlung (Rosa et al., 1985 b) aus den Lysaten partiell gereinigt. Durch reduzierende SDS-PAGE wurden die Secretogranine I und II voneinander getrennt. Ein Fluorogramm des Geles ist abgebildet. Die Positionen von Molekulargewichtstandards und die der Secretogranine sind angezeigt.

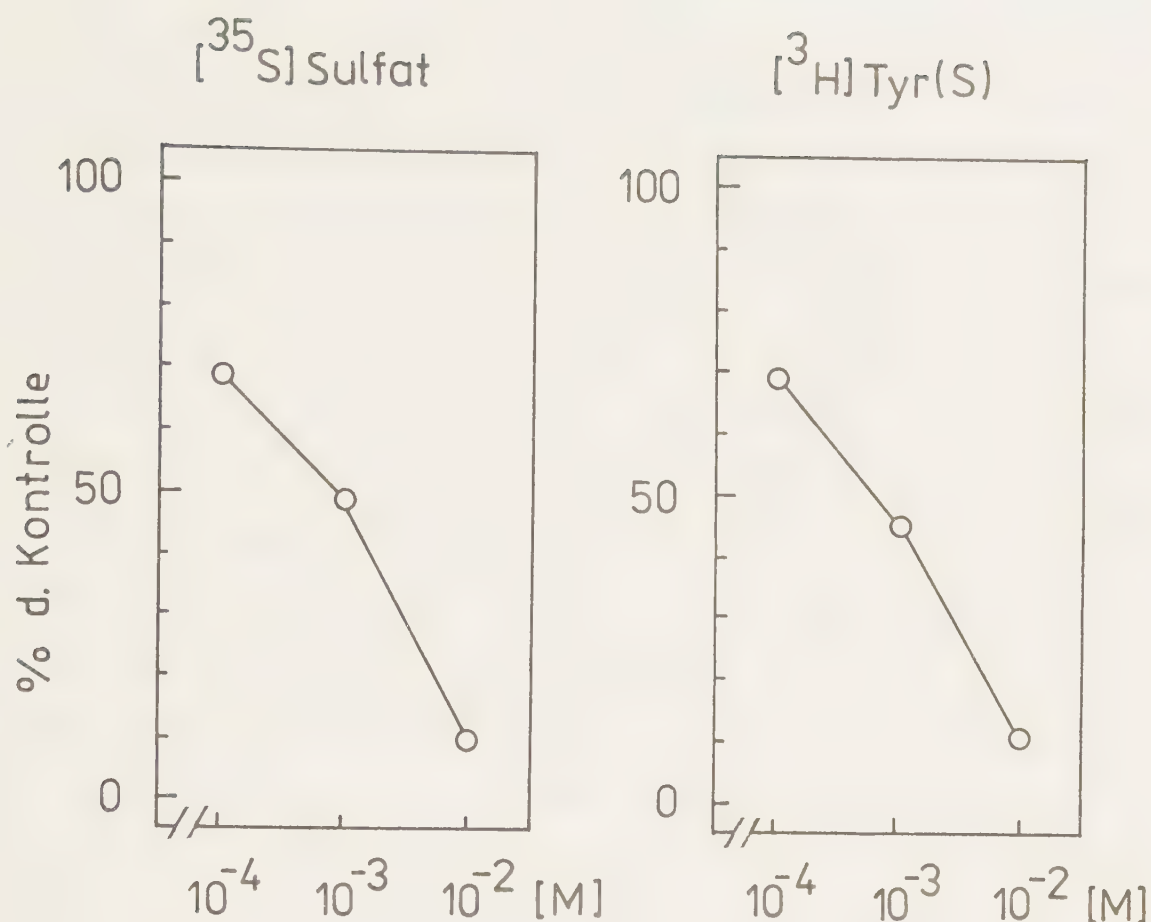


Abb.7.5.: Der Einfluß von Chlorat auf den Einbau von $[^{35}\text{S}]$ Sulfat und auf die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung von Secretogranin II. Linke Abbildung: PC12-Zellen wurden unter den angegebenen Konzentrationen von Chlorat im Medium mit $[^{35}\text{S}]$ Sulfat markiert und die Zellysate anschließend durch SDS-PAGE analysiert. Aufgetragen ist die Radioaktivität, die in der Position von Secretogranin II migrierte (siehe Abb.7.10.), bezogen auf die Kontrolle. Rechte Abbildung: Von $[^3\text{H}]$ Tyrosin-markiertem, partiell gereinigtem Secretogranin II (siehe Abb.7.5.), das unter den angegebenen Konzentrationen von Chlorat markiert wurde, wurde eine Analyse der Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung, wie in Abb.5.6. und Tab.5.2. beschrieben, durchgeführt. Die erhaltenen Werte sind als Prozent der Kontrolle aufgetragen.

markiert und die Secretogranine I und II nach partieller Reinigung (Abb.7.4.; nach Rosa et al., 1985b) auf die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung hin untersucht. Bei diesem Experiment wurden alle Zellkulturen kurz vor Ende der Markierungsperiode auf gleiche Chloratkonzentrationen gebracht. Nach partieller Reinigung und SDS-PAGE der Secretogranine war nach Fluorographie keine Korrelation zwischen dem Einbau von radioaktivem Tyrosin und den verschiedenen Chloratkonzentrationen festzustellen (Abb.7.4.). Nach alkalischer Hydrolyse der Secretogranine und anschließender Trennung von (^3H)Tyrosinsulfat und (^3H)Tyrosin durch eindimensionale Dünnschichtelektrophorese wurde die Radioaktivität im Tyrosin und Tyrosinsulfatfleck bestimmt. Wie in Abb.7.5. (rechts) gezeigt ist, nimmt in Secretogranin II (und I, nicht abgebildet) das Verhältnis von (^3H)Tyrosinsulfat zu (^3H)Tyrosin in einer dosisabhängigen Weise nach Chloratbehandlung der Zellen ab. Die dosisabhängige Abnahme lief dabei vollkommen parallel mit der dosisabhängigen Abnahme der (^{35}S)Sulfatinkorporation (Abb.7.5., links; nur für Secretogranin II überprüft). Dies lässt den Schluß zu, daß die Hemmung der radioaktiven Sulfatinkorporation, die nach Chloratbehandlung intakter Zellen beobachtet wird, tatsächlich auf einer echten Hemmung der Tyrosinsulfatierung beruht.

7.5. Die Konzentrationen von Methionin und Cystein im Medium beeinflussen den Einbau von radioaktivem Sulfat in

Proteine.

Wenn Chlorat auch in intakten Zellen mit Sulfat um die Sulfatbindestelle in der ATP-Sulfurylase konkuriert, müßte der Effekt von Chlorat durch eine Absenkung der intrazellulären Sulfatkonzentration potenzierbar sein. Die intrazelluläre Sulfatkonzentration kann in Zellkulturen zum einen durch die Verwendung von sulfatfreiem Medium gesenkt werden, da Sulfat relativ schnell zwischen Zellinnerem und Medium ausgetauscht wird (Schwarz, 1982). Zum anderen kann dies durch die Reduktion der intrazellulären de novo Synthese von anorganischem Sulfat aus schwefelhaltigen Aminosäuren erreicht werden, in dem die Zufuhr der betreffenden Aminosäuren (Methionin und Cystein) über das Medium reduziert wird. Ob diese Maßnahmen in PC12-Zellen die intrazelluläre Sulfatkonzentration absenken, wird hier indirekt dadurch untersucht, ob sich die spezifische Aktivität des in Proteine eingebauten Sulfats erhöht.

PC12-Zellen wurden in der Anwesenheit von 100%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01% und 0,001% der normalen DMEM-Konzentrationen von Methionin und Cystein im Medium mit (^3H)Tyrosin oder (^{35}S)Sulfat markiert. Wie für Konzentrationen von Methionin und Cystein von 100-0,1% gezeigt ist, veränderte sich der Einbau von Tyrosin in Proteine nicht auffällig (Abb.7.6., links). Der Einbau von radioaktivem Sulfat in Proteine hingegen nahm mit der Abnahme von Methionin und Cystein im Medium drastisch zu (Abb.7.6., rechts). Aus der

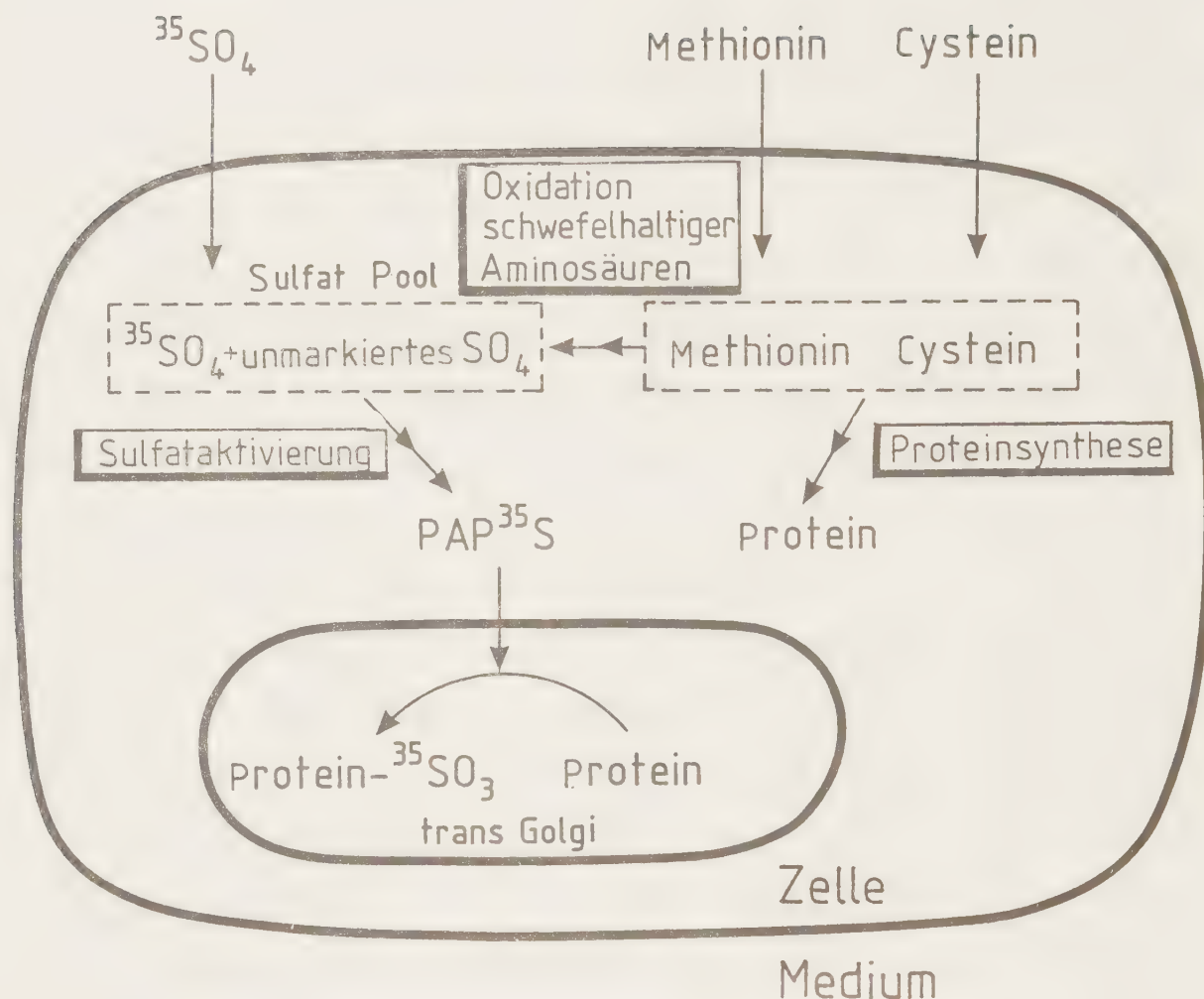


Abb.7.8.: Der Zusammenhang zwischen dem Metabolismus von Methionin und Cystein und dem von Sulfat in der Zelle.

Die Aminosäuren Methionin und Cystein sind durch zwei separate Stoffwechselwege miteinander verbunden. In der Zelle kann Methionin aus Cystein und Cystein aus Methionin synthetisiert werden (siehe Mulder, 1981b; Finkelstein und Martin, 1984). Wenn die Aminosäuren im Überschuß vorhanden sind, was in DMEM der Fall ist, werden die Aminosäuren nicht nur zur Proteinsynthese verwendet, sondern auch als Energieträger verstoffwechselt (siehe Livesey, 1984; Krijgsheld et al., 1981). Ein Endprodukt des Abbaus von Methionin und Cystein in höheren Tieren ist dabei freies Sulfat (siehe Livesey, 1984). In Zellkulturen reichert dieses Sulfat den bestehenden intrazellulären Sulfatpool mit nicht markiertem Sulfat an, das dann zusammen mit dem radioaktiven Sulfat, das aus dem Medium in die Zelle kommt, den aktuellen Sulfatpool mit einer bestimmten spezifischen Aktivität darstellt. Durch die Verringerung von Methionin und Cystein im Medium und die dadurch resultierende Verringerung von Methionin und Cystein in der Zelle, wird der Abbau dieser beiden Aminosäuren gesenkt, da sie für die Proteinsynthese verwendet werden. Dadurch geht weniger nicht-markiertes Sulfat in den intrazellulären Pool ein und die spezifische Aktivität im intrazellulären Sulfatpool steigt an, was letztlich dazu führt, daß mehr Radioaktivität (aber nicht notwendigerweise mehr Sulfat) in Proteine eingebaut wird.

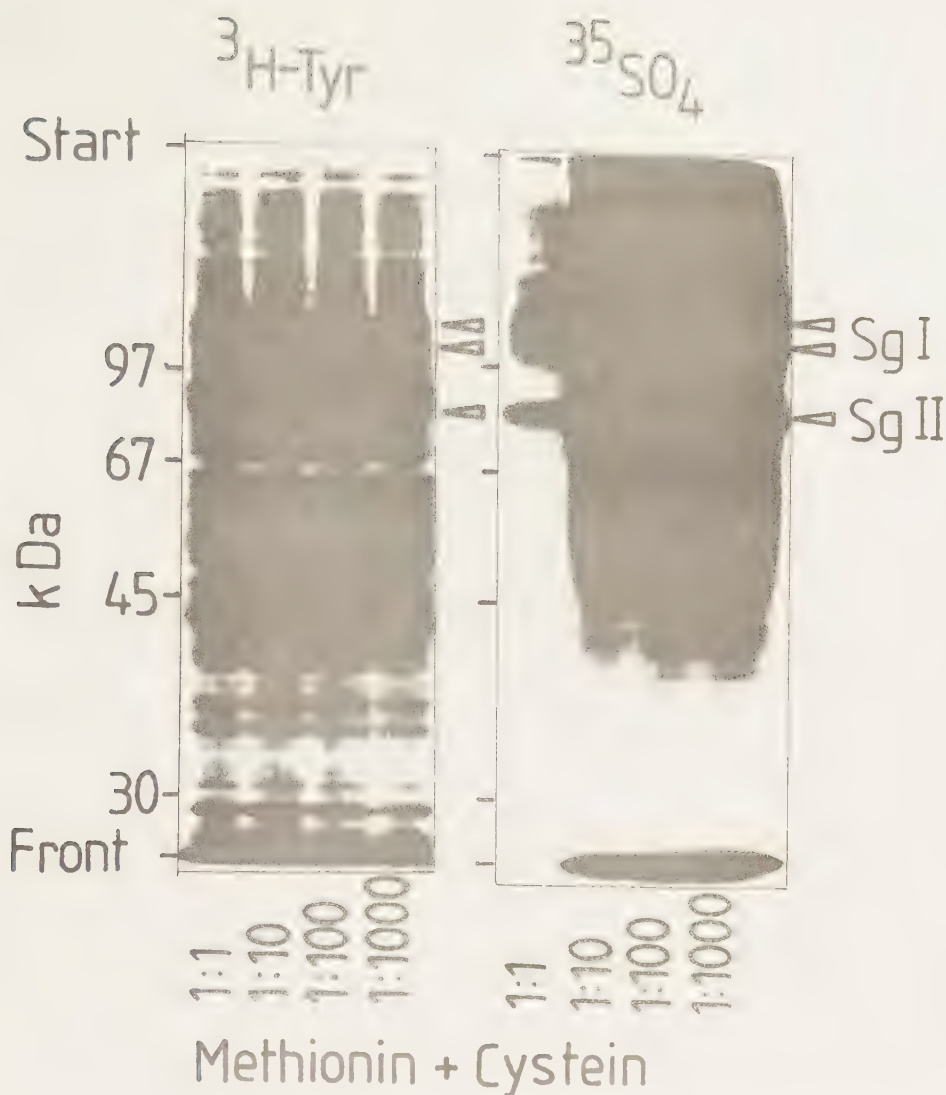


Abb.7.6. : Der Einfluß der Konzentrationen von Methionin und Cystein im Medium auf den Einbau von [³H]Tyrosin und [³⁵S]Sulfat in Proteine von PC12-Zellen. PC12-Zellen wurden mit [³H]Tyrosin oder [³⁵S]Sulfat unter variablen Konzentrationen von Methionin und Cystein im Medium markiert und die Zellysate durch reduzierende SDS-PAGE auf 8%-Gelen analysiert. Gezeigt sind Fluorogramme. Die Konzentrationen von Methionin und Cystein sind als Verdünnungen der DMEM-Konzentrationen von Methionin und Cystein angegeben. Die Positionen von Molekulargewichtstandards und die der Secretogranine I und II sind angezeigt.

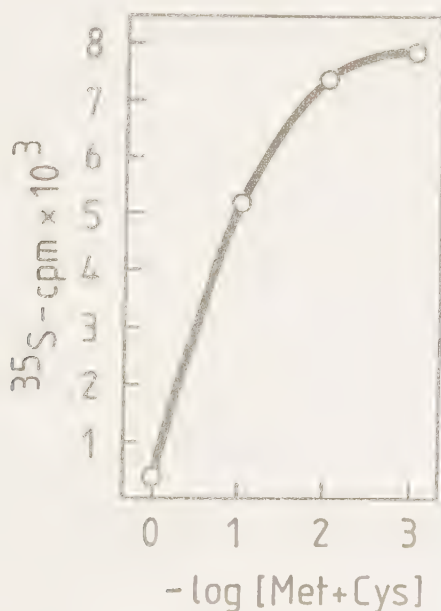


Abb.7.7.: Der Effekt reduzierter Konzentrationen von Methionin und Cystein auf die Inkorporation von (³⁵S)Sulfat in Makromoleküle von PC12-Zellen. PC12-Zellen wurden unter den angegebenen Verdünnungen der DMEM-Konzentrationen von Methionin und Cystein im Medium mit (³⁵S)Sulfat markiert und die Zellysate durch reduzierende SDS-PAGE analysiert. Die Radioaktivität in der Gelregion >97 kDa wurde bestimmt und gegen den negativen Logarithmus der Methionin- und Cysteinkonzentration aufgetragen.

halblogarithmischen Auftragung in Abb.7.7. ist ersichtlich, daß der Einbau von radioaktivem Sulfat linear um das ca 13-fache zunahm, nachdem Methionin und Cystein im Medium um den Faktor 10 reduziert wurden, und um das 19-fache nach Reduktion auf 1%. Nach weiterer Reduktion von Methionin und Cystein auf 0,1% erreichte der Einbau von radioaktivem Sulfat ein Plateau (Abb.7.7.). Wahrscheinlich tritt bei zu geringen Konzentrationen der Aminosäuren eine Hemmung der Proteinsynthese ein, da die entsprechenden transfer-RNAs für die Proteinsynthese nicht mehr aktiviert werden können. Die hier gemachten Beobachtungen legen nahe, daß in der Tat die Absenkung der Konzentrationen von schwefelhaltigen Aminosäuren im Medium die intrazelluläre Sulfatkonzentration absenken kann. Der dramatische Anstieg der Inkorporation von radioaktivem Sulfat in Proteine war wahrscheinlich durch eine erhöhte spezifische Aktivität des radioaktiven Sulfates bedingt. Eine unspezifische Stimulation der Sulfatierungsreaktion hingegen ist sehr unwahrscheinlich. Abb.7.8. veranschaulicht den Einfluß, den der Metabolismus schwefelhaltiger Aminosäuren auf den Sulfatstoffwechsel unter Zellkulturbedingungen hat.

Die hier gemachten Beobachtungen lassen sich folgendermaßen anwenden:

In Markierungsexperimenten kann ein höherer Einbau von (^{35}S)Sulfat-Radioaktivität erreicht werden, was die Auffindung und Analyse wenig abündanter Sulfoproteine erleichtern kann. Der Pool an intrazellulärem Sulfat kann

manipuliert werden. Dies wird nun angewendet, um den Effekt von Chlorat zu analysieren und möglicherweise zu potenzieren.

7.6. Die Verringerung von Cystein und Methionin im Medium potenziert den hemmenden Effekt von Chlorat auf die Proteinsulfatierung.

Wie in Abschnitt 7.5. gezeigt ist, kann durch Verringerung von Methionin und Cystein im Medium die intrazelluläre Konzentration von Sulfat offenbar abgesenkt werden. Wenn Chlorat auch in intakten Zellen als ein sulfat-analoges Anion mit Sulfat um die Bindungsstelle der ATP-Sulfurylase konkuriert (vergl. Farley, 1978), müßte der inhibierende Effekt von Chlorat durch eine Absenkung der intrazellulären Sulfatkonzentration potenzierbar sein. Eine solche Situation wurde untersucht, in dem nur 1% der normalen DMEM-Konzentration von Methionin und Cystein in sulfatfreiem Medium verwendet wurde. Wie in dem Fluorogramm in Abb.7.9. nach SDS-PAGE (^{35}S)Sulfat-markierter Proteine von PC12-Zellen gezeigt ist, wird unter normalen Methionin- und Cystein-Verhältnissen die Sulfatierung der Secretogranine bei 1 mM Chlorat zu etwa 50% gehemmt (Abb.7.9., links). Nach Reduktion der schwefelhaltigen Aminosäuren auf 1% der normalen DMEM-Konzentration ist zwar der Einbau von Radioaktivität in Proteine erhöht (vgl. Abschnitt 7.5.), aber die Sulfatierung der Secretogranine bereits bei 1 mM

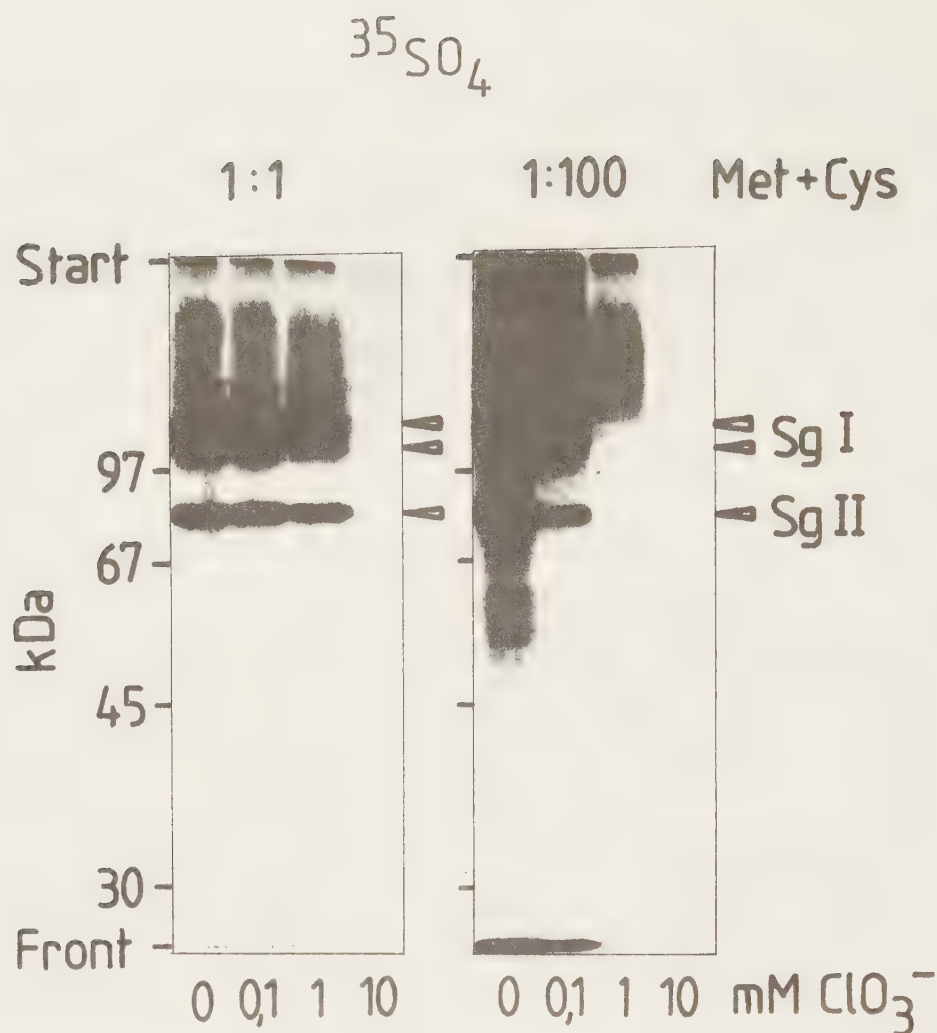


Abb.7.9.: Der Effekt reduzierter Konzentrationen von Methionin und Cystein auf die sulfatierungshemmende Wirkung von Chlorat. PC12-Zellen wurden unter normalen und 1:100 reduzierten Konzentrationen von Methionin und Cystein in der Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Chlorat mit [^{35}S]Sulfat markiert. Zellysate wurden anschließend unter reduzierenden Bedingungen auf 8%-Gelen durch SDS-PAGE analysiert. Fluorogramme sind abgebildet. Die Positionen von Molekulargewichtstandards und die der Secretogranine I und II sind angezeigt.

Chlorat zu mehr als 98% gehemmt (Abb.7.9., rechts). Der (^{35}S)Sulfateinbau in Makromoleküle mit einer Molmasse >97 kDa (wahrscheinlich Proteoglykane) wurde bei 1 mM Chlorat nur zu 90% gehemmt. Die vorliegenden Befunde zeigen, daß durch Reduktion der schwefelhaltigen Aminosäuren in sulfatfreiem Medium die Wirkung von Chlorat potenziert werden kann.

7.7. Quantifizierung des hemmenden Effektes von Chlorat auf die Tyrosinsulfatierung von Secretogranin I und II unter normalen und reduzierten Konzentrationen von Methionin und Cystein.

PC12-Zellen wurden mit (^3H)Tyrosin unter verschiedenen Chloratkonzentrationen markiert und die Secretogranine nach partieller Reinigung durch SDS-PAGE getrennt (Abb.7.4.). Nach alkalischer Hydrolyse von Secretogranin I und II und eindimensionaler Dünnschichtelektrophorese der Hydrolysate wurde bestimmt, wieviel Prozent des Tyrosins in den Proteinen als Tyrosinsulfat vorlag. Unter Kontrollbedingungen fanden sich in Secretogranin I 7% der Tyrosinreste als Tyrosinsulfat und in Secretogranin II 6,5% (Abb.7.10; linke Kreise). Bei auf 1% reduzierten Methionin- und Cysteinkonzentrationen waren in Secretogranin I noch 3,7% und in Secretogranin II noch 1,9% der Tyrosinreste sulfatiert (Abb.7.10., linke Dreiecke). Dies zeigte, daß bereits nach Verminderung der intrazellulären Sulfatkonzentration eine Hemmung der Tyrosinsulfatierung um

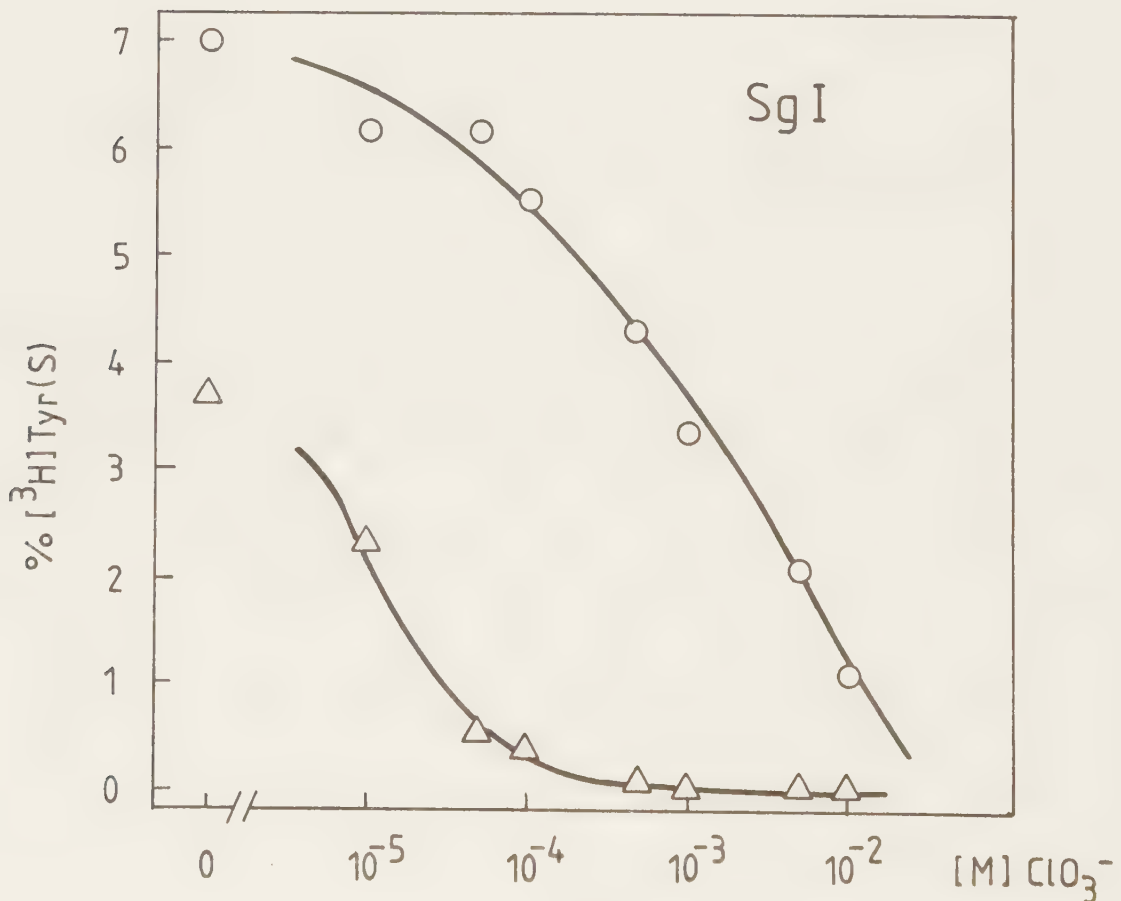
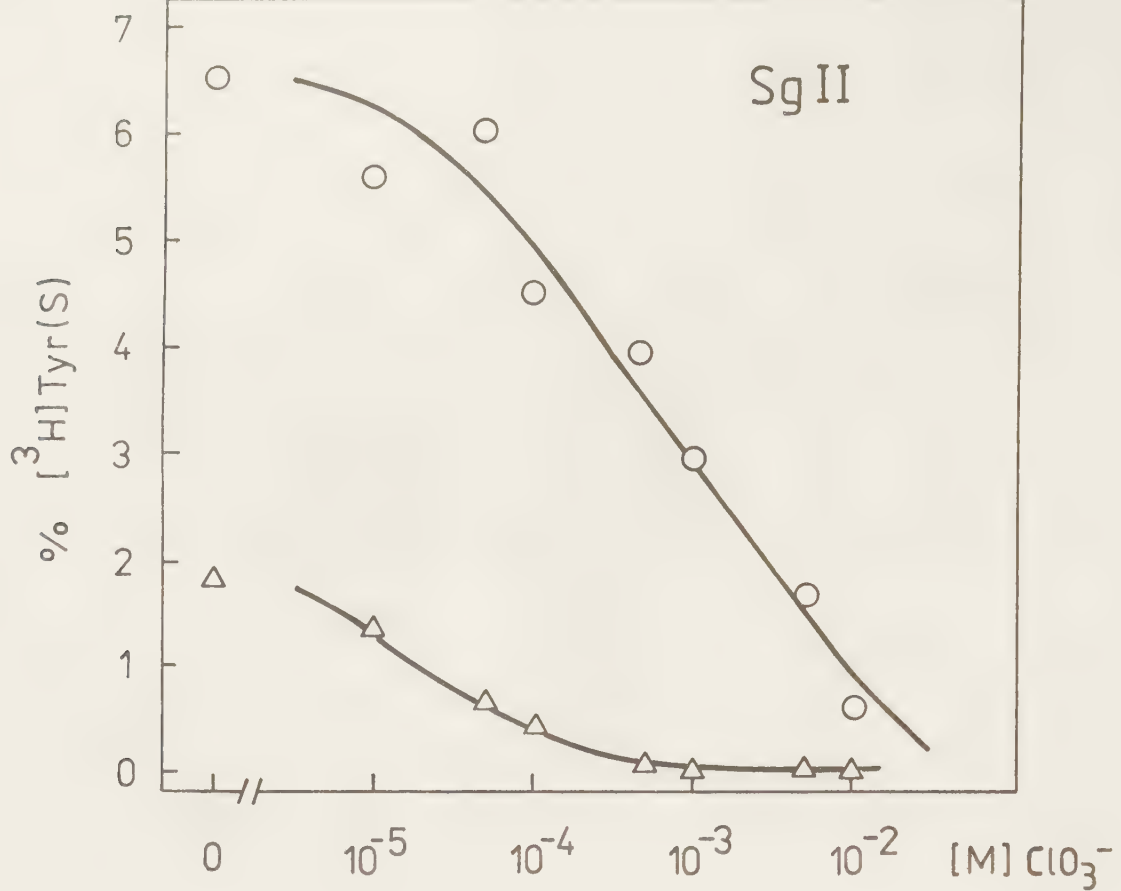


Abb. 7.10.: Dosis-Wirkungskurven der Inhibition der Tyrosinsulfatierung der Secretogranine I und II in PC12-Zellen bei verschiedenen Konzentrationen von Methionin und Cystein durch Chlorat. PC12-Zellen wurden unter normalen und 1:100 reduzierten Konzentrationen von Methionin und Cystein bei variablen Konzentrationen von Chlorat mit [³H]Tyrosin markiert. Die Secretogranine I und II wurden nach partieller Reinigung (siehe Abb. 7.5.) einer Bestimmung der Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung unterzogen (Methode siehe Kapitel 5.5.). Die Stöchiometrie ist als Prozent [³H]Tyrosinsulfat an gesamtem inkorporiertem [³H]Tyrosin angegeben. Kreise: normale DMEM-Konzentrationen von Methionin und Cystein; Dreiecke: 1:100 reduzierte DMEM-Konzentrationen von Methionin und Cystein.

mehr als 50% eintritt, obwohl der Einbau von Radioaktivität erhöht war (vgl. Abb.7.9.). Unter dieser Bedingung kann bereits 1 mM Chlorat die Tyrosinsulfatierung nahezu vollständig hemmen (Abb.7.10, Dreiecke).

Die ID_{50} -Werte bei normalen DMEM-Konzentrationen von Methionin und Cystein lagen bei ca 1 mM Chlorat (Abb.7.10.; Kreise). Die ID_{50} -Werte nach Reduktion von Methionin und Cystein auf 1% lagen bei weniger als 20 μ M Chlorat (Abb.7.10.; Dreiecke). Das bedeutet, daß durch die Absenkung der Konzentrationen von Methionin und Cystein auf 1% der hemmende Effekt von Chlorat um mehr als das fünfzigfache potenziert wurde.

7.8. Chlorat hemmt die Bildung von (^{35}S)APS und (^{35}S)PAPS in intakten Zellen.

In vitro hemmt Chlorat die Synthese von Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) durch kompetitive Hemmung der ATP-Sulfurylase (Farley et al., 1978). Um zu untersuchen, ob Chlorat ebenfalls in vivo eine Hemmung der Synthese von APS hervorruft, wurde untersucht ob Chlorat in intakten Zellen die Bildung von radioaktivem APS (und folglich auch PAPS) in einer dosisabhängigen Weise hemmt. 81-04 Zellen wurden bei verschiedenen Chloratkonzentrationen mit (^{35}S)Sulfat markiert. Anschließend wurde radioaktives APS und PAPS aus Zellysaten isoliert und durch Dünnschichtelektrophorese und Autoradiographie (nicht abgebildet) analysiert. Wie in Abb.7.11. nach Szintillationszählung der APS- und PAPS-Flecken der Dünnschichtplatte gezeigt ist, hemmt Chlorat in einer dosisabhängigen Weise den Einbau von (^{35}S)Sulfat in beide Nukleotide. Dies ist im Einklang mit einem möglichen Angriffsort des Chlorates auf Ebene der Kosubstratsynthese.

Bei 1 mM Chlorat, wo die Sulfatinkorporation in Proteine (bei normalen Konzentrationen von Methionin und Cystein) um ca 50% gehemmt ist, ist die Synthese von radioaktivem APS bereits um 90% gehemmt und die von PAPS um 95% (Abb.7.11.). Obgleich die PAPS-Konzentration um den Faktor 20 reduziert ist, können offenbar die Sulfotransferasen und der PAPS-Translokator des Golgi noch effizient arbeiten, was auf

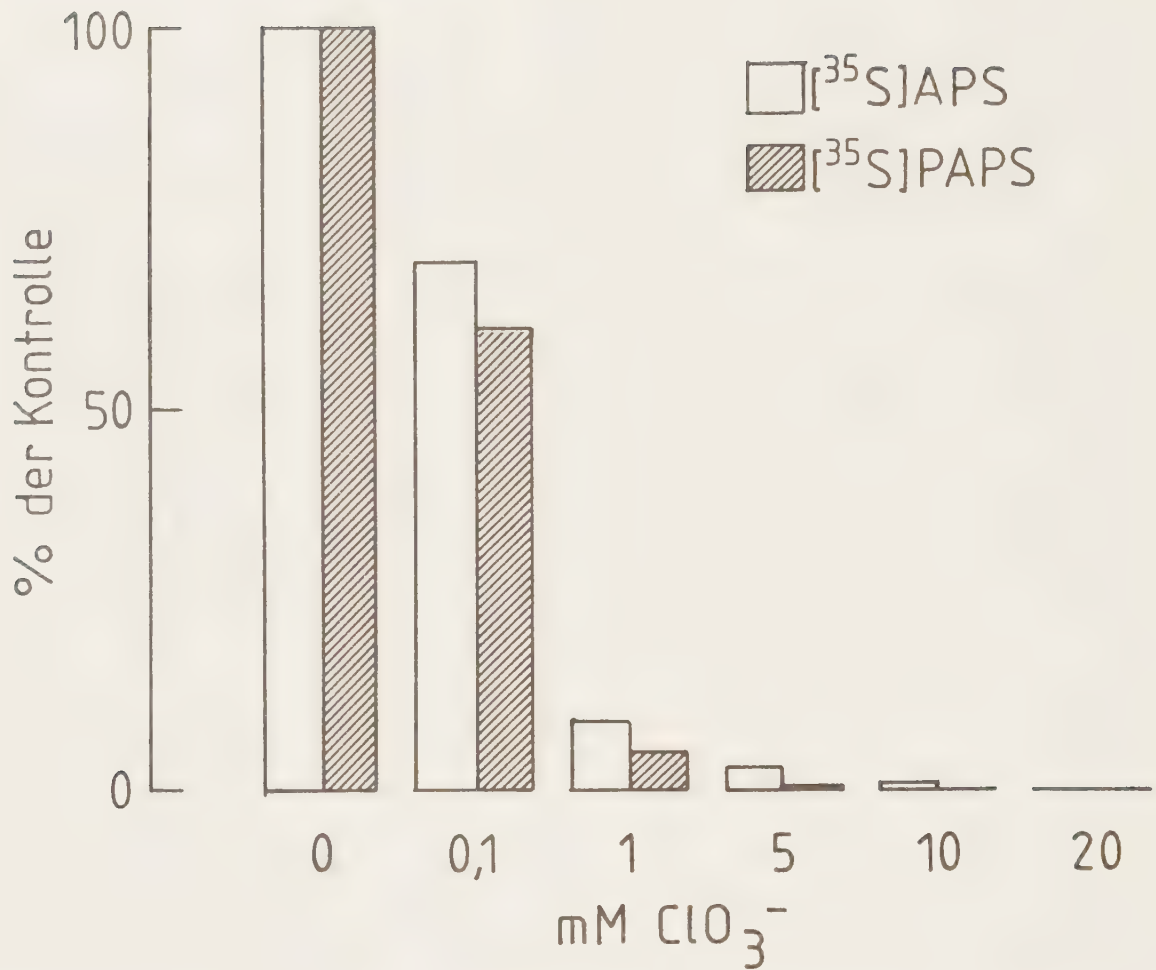


Abb.7.11.: Der Effekt von Chlorat auf die Bildung von (^{35}S)Sulfat-markiertem APS und PAPS in intakten Zellen. PC12-Zellen wurden mit (^{35}S)Sulfat bei verschiedenen Konzentrationen von Chlorat markiert (in Medium mit normalen Methionin- und CysteinKonzentrationen). Radioaktives APS und PAPS in den Überständen der Zellysate nach Kochen wurden durch Dünnschichtelektrophorese aufgetrennt. Nach Autoradiographie der Dünnschichtplatte wurde die Radioaktivität in den Positionen von APS und PAPS bestimmt. Die Signale für APS und PAPS unter Kontrollbedingungen waren 878 cpm bzw. 668 cpm.

entsprechend niedrige Michaliskonstanten der Proteine für PAPS hindeutet.

Zusammengefasst legen die vorliegenden Ergebnisse nahe, daß Chlorat in Zellen aufgenommen wird, wo es, wie unter in vitro Bedingungen, die ATP-Sulfurylasereaktion hemmt. Dabei bedingt die Hemmung der Synthese von APS eine Hemmung der Synthese von PAPS. Die Reduktion des Kosubstratspiegels führt schließlich zu einer Hemmung der Tyrosinsulfatierung im trans Golgi Netzwerk. Da PAPS das Kosubstrat für alle bekannten Sulfotransferasereaktionen ist (siehe Mulder et al.; 1982), wird erwartet, daß Chlorat gleichfalls die Sulfatierung von Kohlenhydratresten in Proteinen und Glykolipiden hemmt, als auch die Sulfatierung von Phenolen, Stereoiden und anderen organischen Molekülen.

DISKUSSION

7.1. Mögliche Artefakte

Wenn eine Substanz nach Gabe zu intakten Zellen eine Hemmung des Einbaus von radioaktivem Sulfat in Proteine hervorruft, muß dies nicht notwendigerweise auf einer Hemmung der Sulfatierungsreaktion im Golgi Apparat beruhen. Folgende andere Ursachen für einen reduzierten Einbau von radioaktivem Sulfat müssen bei der Charakterisierung eines Inhibitors bedacht und ausgeschlossen werden:

(1) Die Substanz selbst kann chemisch reaktiv sein und zu einer Entfernung von Sulfatgruppen, die kovalent an Proteine gebunden sind, führen. Es ist auch möglich, daß die Substanz in der Zelle eine desulfatierende Enzymaktivität induziert.

(2) Die Substanz senkt lediglich die spezifische Aktivität des radioaktiven Sulfates, das ursprünglich den Zellen von außen zugegeben wurde. Es kann ungehindert Sulfat in Proteine eingebaut werden, aber das eingebaute Sulfat ist weniger radioaktiv geworden. Folgende Ursachen für eine reduzierte spezifische Aktivität des radioaktiven Sulfates sind denkbar: (i) Die Substanz hemmt die Aufnahme von radioaktivem Sulfat aus dem Medium. Nur das endogene, nicht markierte Sulfat (z.B. de novo durch den Katabolismus von schwefelhaltigen Aminosäuren erzeugt) wird zur Sulfatierung verwendet. (ii) Die Substanz stimuliert den Katabolismus von Methionin und Cystein und damit die Entstehung von

unmarkiertem Sulfat. (iii) Aus der Substanz selbst kann unmarkiertes Sulfat entstehen.

(3) Die Substanz hemmt die Proteinsynthese und führt dazu, daß die Sulfotransferasen nicht mehr ausreichend mit Proteinsubstrat versorgt werden. Klassische Proteinsynthesehemmer, wie z.B. Cycloheximid, täuschen daher eine Hemmung der Proteinsulfatierung vor (Huttner und Lee, 1982).

In Falle von Chlorat zeigen die folgenden experimentellen Befunde, daß offenbar die Proteinsulfatierungsreaktion gehemmt wurde und die Hemmung nicht etwa durch die Verfügbarkeit des Proteinsubstrates, eine reduzierte spezifische Aktivität des radioaktiven Sulfates oder eine desulfatierende Aktivität hervorgerufen wurde.

Zu (1). Eine Behandlung radioaktiv markierter tyrosinsulfatierter Proteine mit 50 mM Chlorat führte nicht zu einem Verlust der Sulfatmarkierung. Ebenso war 10 mM Chlorat, das gegen Ende von Markierungsversuchen zu Zellkulturen zugesetzt wurde, ohne Effekt auf die Proteinsulfatierung. Die Aktivierung einer desulfatierenden enzymatischen Aktivität ist unwahrscheinlich, da eine solche Aktivität in Lysaten von PC12-Zellen bisher noch nie beobachtet wurde (Huttner, unpublizierte Befunde).

Zu (2). Vor allem die Beobachtung, daß die Abnahme der Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung der Secretogranine parallel mit der Abnahme des radioaktiven Sulfateinbaus in die Proteine verläuft, spricht dagegen, daß Chlorat die

spezifische Aktivität des radioaktiven Sulfates signifikant beeinflusste. Die Aufnahme von radioaktivem Sulfat in PC12- und Hybridomazellen wurde bei keiner der getesteten Chloratkonzentrationen verhindert (bis 20 mM getestet; nicht abgebildet). Die Hemmung des radioaktiven Sulfateinbaus durch Chlorat war für die Secretogranine effektiver als für die Proteoglykane (Abb.7.9.; rechts). Unter der Annahme, daß die verschiedenen Sulfotransferasen, die die Secretogranine bzw. die Proteoglykane sulfatieren, den gleichen Kosubstratpool benutzen, spricht die selektive Hemmung durch Chlorat ebenfalls gegen einen Einfluß der Substanz auf die spezifische Aktivität des Sulfates.

Zu (3). Wie durch den Einbau von radioaktivem Tyrosin in die Substratproteine Secretogranin I und II und in andere zelluläre Proteine gezeigt wurde, hatte Chlorat bis zu einer Konzentration von 20 mM keinen signifikanten Einfluß auf die Proteinsynthese.

7.2. Chlorat führt zu einer echten Hemmung der Proteinsulfatierung

Zwei Befunde sprechen dafür, daß Chlorat ein echter Hemmer der Proteinsulfatierung ist:

(1) Chlorat reduziert die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung der Secretogranine I und II in einer dosisabhängigen Weise. Die Stöchiometrie der Tyrosinsulfatierung wurde dabei durch eine Methode bestimmt, die von radioaktiver Sulfatinkorporation unabhängig war.

(2) Heterolog exprimiertes Dotterprotein 2 (siehe Kapitel 6, Diskussion), das von Chlorat behandelten L-Zellen produziert wird, migriert bei isoelektrischer Fokussierung in der Position von unsulfatiertem (mutiertem) Dotterprotein 2 (Dr. E. Friederich, unpubliziert). Dabei fokussiert unsulfatiertes Dotterprotein 2 auf Grund der verlorengegangenen negativen Ladung bei einem basischeren pH-Wert als das sulfatierte Dotterprotein 2.

7.3. Die Wirkungsweise von Chlorat in intakten Zellen

Folgende Befunde sprechen dafür, daß Chlorat nicht nur in vitro als ein Inhibitor der ATP-Sulfurylase wirkt, sondern auch in intakten Zellen:

(1) Chlorat hemmt in einer dosisabhängigen Weise die Synthese von radioaktivem APS in intakten Zellen. Die gleichzeitig beobachtete Hemmung der Synthese von radioaktivem PAPS, könnte aus der Hemmung der Synthese von APS resultiert haben. Da es keinen Anhaltspunkt dafür gibt, daß Chlorat einen Einfluß auf die spezifische Aktivität des radioaktiven Sulfates hat (siehe Abschnitt 7.1. und 7.2.), sollte die beobachtete Hemmung der Inkorporation von radioaktivem Sulfat in APS und PAPS eine wirkliche Absenkung der intrazellulären APS- und PAPS-Spiegel widerspiegeln. Bei der gereinigten ATP-Sulfurylase aus Rattenleber fanden Burnell und Roy et al. (1978), daß Chlorat bei einer Konzentration von 0,25 mM die Synthese von APS um 50% inhibierte. In PC12-Zellen findet sich bei ca 1 mM Chlorat

(normales Methionin und Cystein) eine 50%-ige Hemmung der Synthese von (radioaktivem) APS. Obgleich nicht bekannt ist wie hoch die aktuelle Konzentration von Chlorat in den Zellen unter diesen Bedingungen ist und ob das gleiche Isoenzym der ATP-Sulfurylase in den PC12-Zellen der Ratte vorhanden ist, sind die Inhibitionskonstanten für Chlorat sehr ähnlich.

(2) Wenn Chlorat gleichfalls in intakten Zellen mit Sulfat um die Bindungsstelle an der ATP-Sulfurylase konkuriert, wird erwartet, daß eine Reduzierung der intrazellulären Sulfatkonzentration den Effekt von Chlorat potenzieren kann. Indirekt wurde gezeigt, daß die Reduzierung der schwefelhaltigen Aminosäuren Methionin und Cystein in sulfatfreiem Medium, die intrazelluläre Sulfatkonzentration absenkt. In der Tat ließ sich durch Absenkung der Konzentrationen von Methionin und Cystein in sulfatfreiem Medium der hemmende Effekt von Chlorat auf die Proteinsulfatierung dramatisch potenzieren. Dies erlaubt es in Zellkulturen eine effiziente Hemmung der Proteinsulfatierung auch bei niedrigen Chloratkonzentrationen zu erreichen.

Alle in den Abschnitten 7.1.-7.3. zusammengefassten Beobachtungen stehen im Einklang damit, daß Chlorat Proteinsulfotransferasereaktionen in intakten Zellen hemmen kann. Mit großer Wahrscheinlichkeit beruht die Wirkung von Chlorat auf einer blockierten Synthese des Kosubstrates der Sulfatierungsreaktionen, PAPS.

7.4. Die Effekte von Chlorat in intakten Zellen und in vivo

Die geringe Toxizität von Chlorat in Zellkulturen lässt vermuten, daß die Hemmung der Synthese von APS und PAPS, die vermutlich in einer Hemmung aller zellulären Sulfotransferasereaktionen resultiert, für einzelne Zellen in Kultur nicht letal ist. Die gleiche Beobachtung kann nach Hemmung der N-Glykosylierung von Proteinen in Zellkulturen durch Tunicamycin gemacht werden. In vivo appliziert ist Tunicamycin jedoch sehr toxisch ($LD_{50} = 1,8$ mg/kg i.v.; siehe Elbein, 1981). Es ist daher denkbar, daß die Modifikationen sekretorischer Proteine nicht so sehr für die sie produzierenden Zellen wichtig sind, sondern erst nach der Sekretion für die modifizierten Proteine im vielzelligen Organismus von einer lebenswichtigen Bedeutung sind. Die LD_{50} von Natriumchlorat in Ratten (oral appliziert) liegt bei 12 g/kg Körpergewicht (Ulrich, 1929). Damit ist Natriumchlorat weniger toxisch als Natriumchlorid (LD_{50} 3,75 g/kg; oral appliziert, Boyd und Shanas, 1963). Es muß jedoch bedacht werden, daß im Organismus sehr viel Sulfat vorhanden ist (im Serum ca 1 mM; siehe Mulder, 1981, S.41). Chlorat müßte daher in vivo in sehr hoher Konzentration angewendet werden, um eine effiziente Hemmung der Sulfatierung zu erreichen. Eine Potenzierung der Chlorateffekte, wie sie in Zellkulturen durch sulfatfreies Medium und die Absenkung von Methionin und Cystein erreicht werden kann, scheint in vivo nicht durchführbar zu sein.

Daß Proteinsulfatierung für eine normale Entwicklung von

Tieren notwendig ist, zeigte die Entdeckung eines rezessiv-vererbbaeren genetischen Defekts in Mäusen. Bei den sogenannten "brachymorphen" Mäusen wurde ein gewebspezifische Verminderung der APS-Kinaseaktivität gefunden (Schwartz et al., 1978; Sugahara und Schwartz, 1979). Die resultierende Verminderung des Sulfatierungskosubstrates PAPS und der dadurch bedingten Hemmung der Sulfatierung von Proteinen und Proteoglykanen führt bei diesen Tieren zu Defekten in der Ausbildung von Knorpel und Bindegewebe. Anatomisch zeigen die brachymorphen Mäuse stark verkürzte Gliedmaßen.

7.5. Anwendung von Chlorat

Da Chlorat wahrscheinlich die Biosynthese von Aktiviertem Sulfat, PAPS, blockiert, kann mit Hilfe von Chlorat die Funktionen aller bekannten Sulfatierungsreaktionen untersucht werden, da bei bisher allen Sulfatierungsreaktionen gezeigt wurde, daß PAPS als Kosubstrat beteiligt ist (siehe z.B. Farooqui, 1980). Die Unspezifität des Sulfatierungsinhibitors Chlorat kann aber auch von Nachteil sein, wenn feststehen sollte, daß die verschiedenartigen Sulfatierungen in intakten Zellen funktionelle Beziehungen haben sollten. In der biosynthetischen Produktion von unsulfatierten Proteinen (und z.B. auch Glykolipiden) könnte die Verwendung von Chlorat einen großen Vorteil bieten, da bisher keine effiziente enzymatische Desulfatierung von Polypeptiden

erreicht wurde. Die in Zellkulturen erzeugten, unsulfatierten Proteine könnten in vivo im Vergleich mit den sulfatierten untersucht werden und in vitro als physiologische Substrate zur Charakterisierung und Reinigung von Sulfotransferasen eingesetzt werden.

A N H A N G

PRÄPARATION VON POLYKLONALEN ANTIKÖRPERN GEGEN DIE
DOTTERPROTEINE 1, 2 UND 3

A.1. Präparation des Antigens

Für immunocytochemische Untersuchungen an mit dem Dotterprotein 2-Gen transfizierten L-Zellen und für Immunopräzipitationen wurden Antiseren sowie affinitätsgereinigte Antikörper gegen Dotterprotein 2 benötigt. Hier wird deren Präparation und Charakterisierung beschrieben.

Auf präparativen eindimensionalen SDS-Gelen wurde Fraktion D (siehe Abb.6.2.) aufgetrennt und, wie in Abb.A.1. gezeigt, die Dotterproteine ausgeschnitten. Das aus diesen Gelstücken mit einer SDS-Lösung eluierte Protein wurde zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet. Die erhaltenen Antiseren wurden mit männchenspezifischen Proteinen präabsorbiert und polyklonale Antikörper durch Affinitätschromatographie an Sepharose 4B gereinigt, an die kovalent die Proteine der Fraktion D gebunden waren. Das Elutionsprofil für eine Reinigung ist in Abb.A.2. gezeigt. Ein Aliquot des Eluates mit 4 M $MgCl_2$ wurde durch SDS-PAGE analysiert und ergab neben einer Verunreinigung durch Kaninchenserumalbumin zwei Banden, die der Schweren und

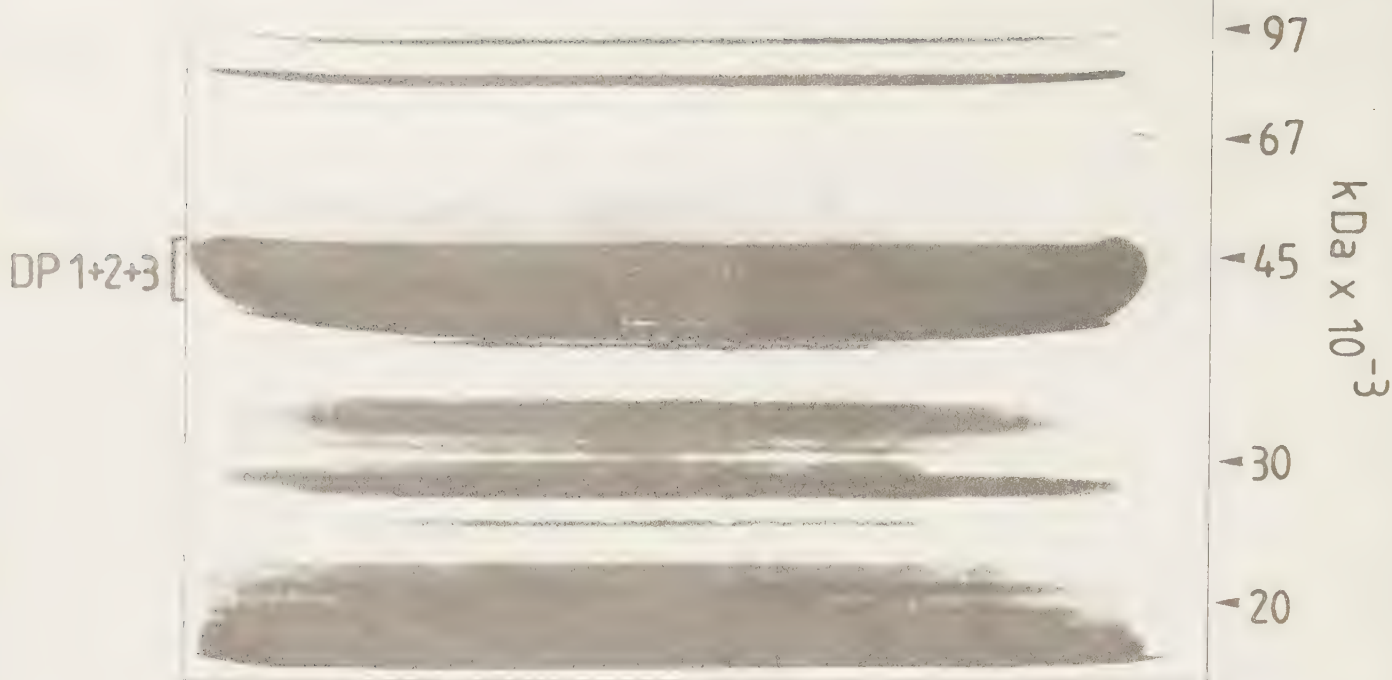


Abb.A.1.: Präparation von Dotterprotein zur Immunisierung durch SDS-PAGE. Proteine der Dotterproteinfraktion D (siehe Abb.6.1. und 6.2) wurden auf einem reduzierenden 10% SDS-Gel getrennt. Die Proteinfärbung mit Coomassie Blau ist gezeigt. Aus Gelstücken der Hauptbande bei 45 kDa (siehe weißes Rechteck) wurde Protein durch SDS-Behandlung eluiert und zur Immunisierung von Kaninchen verwendet. Für jeden Immunisierungsschritt wurde das Eluat eines Gelstückes der abgebildeten Größe (weißes Rechteck) verwendet. An der linken Seite sind die Positionen der Dotterproteine und an der rechten die von Molekulargewichtstandards angezeigt.

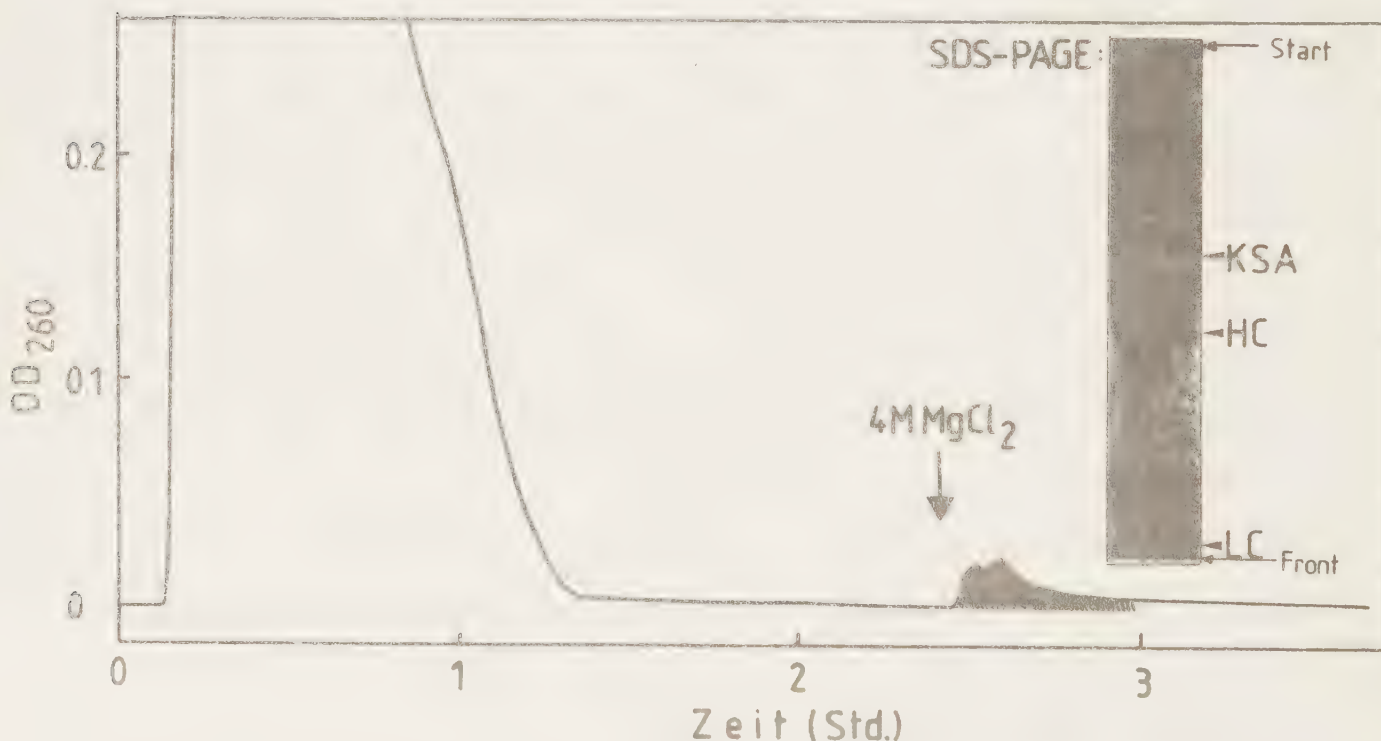


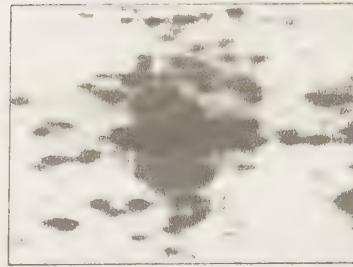
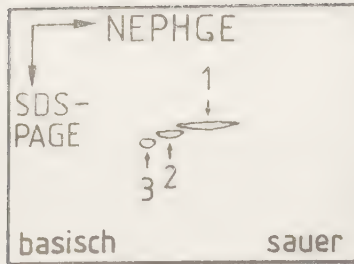
Abb.A.2.: Affinitätschromatographische Reinigung von Dotterprotein-spezifischen Immunglobulinen. Das Antiserum eines Kaninchens nach der vierten Boosterinjektion wurde mit SDS-denaturiertem Protein aus *Phaenicia sericata* (Muscophilidae) präabsorbiert. Das so behandelte Antiserum wurde mit Sepharose 4B, an die kovalent Proteine der Dotterproteinfraktion D gekoppelt waren, inkubiert. Abgebildet ist das Elutionsprofil der Antiserumproteine von der Dotterprotein-Sepharosesäule (gemessen bei 260 nm mit einem Uvicord, LKB) nach Waschen mit Puffer. Spezifisch gebundene Antikörper wurden mit 4M Magnesiumchlorid eluiert (schraffierte Fläche). Ein Aliquot des Eluates wurde durch reduzierende SDS-PAGE und anschließende Proteinfärbung mit Coomassie Blau analysiert. Die Positionen von Kaninchenserumalbumin und der Schwere Kette und der Leichten Kette des IgG sind angezeigt.

Leichten Kette des IgG entsprachen (Abb.A.2.).

A.2. Test der Antiseren und affinitätsgereinigten Antikörper

Die gewonnenen affinitätsgereinigten Antikörper wurden bei einer Proteinkonzentration von $0,2 \mu\text{g/ml}$ und die Antiseren bei einer Verdünnung von 1:500 bzw. 1:5000 getestet. Für den Test wurden in vivo mit (^{35}S) Sulfat-markierte Fliegenproteine durch NEPHGE getrennt, anschließend auf Nitrocellulosefilter übertragen und die Filter fluorographiert (Abb.A.3., linke Hälfte). Um die Effizienz des Proteintransfers zu zeigen, wurde ein Filter mit Amidoschwarz gefärbt (Abb.A.3.; rechte Hälfte oben). Vier andere Filter wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Antiseren oder IgG inkubiert. Gebundenes IgG wurde anschließend durch Bindung von (^{125}J) Protein A und anschließender Fluorographie sichtbar gemacht (Abb.A.3.; rechte Hälfte). Im Falle des Kontrollantiserums war nach Fluorographie keine Addition von (^{125}J) -Protein A-Markierung zur Sulfatmarkierung zu beobachten. Die spezifischen Antiseren und das affinitätsgereinigte IgG reagierten jedoch mit allen drei Dotterproteinen (Abb.A.3.; linke Hälfte). Keine anderen Proteine des Fliegenhomogenates wurden durch die Antiseren erkannt.

Die Antiseren und affinitätsgereinigten Antikörper wurden von Dr. Friederich für Immunopräzipitation und



Kontroll-
Antiserum
1:500



aff. gereinigtes
IgG
0,2 µg/ml



Antiserum
1:5000



Antiserum
1:500

$^{35}\text{S}\text{O}_4$

$^{35}\text{S}\text{O}_4 +$
 ^{125}J -Protein A

Abb.A.3.: Test der Antiseren und affinitätsgereinigten Antikörper.
Ein Totalhomogenat [^{35}S]Sulfat-markierter weiblicher Drosophilafliegen wurde durch zweidimensionale PAGE (NEPHGE) getrennt und die Proteine auf Nitrocellulosefilter übertragen. Links sind Ausschnitte aus den Autoradiogrammen der Filter gezeigt. Das Schema links oben gibt die Positionen der Dotterproteine 1, 2 und 3 in diesen Ausschnitten wieder. Rechts daneben ist die Proteinfärbung eines Nitrocellulosefilters mit Amidoschwarz gezeigt. Um eine gute Färbung zu erzielen, wurde für diesen Filter mehr Totalhomogenat verwendet, als für die anderen Filter. Die Filter wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Antikörpern inkubiert. Nach Inkubation mit [^{125}J]Protein A wurden die Filter für dieselbe Zeit fluorographiert, wie sie zuvor autoradiographiert wurden. Die Fluorogramme sind rechts abgebildet.

Immunofluoreszenzuntersuchungen bei
Transfektionsexperimenten mit dem Dotterprotein-2-Gen in
heterologen Zellen eingesetzt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- Adrian TE, Domin J, Bacarese-Hamilton AJ, Bloom SR (1986) FEBS Letters 196: 5-8.
- Alix J-H, Hayes D (1983) Biol Cell 47: 139-160
- Althaus FR, Hilz H, Shall S (1985) ADP-Ribosylation of Proteins. Berlin: Springer Verlag.
- Anastasi A, Bernardi L, Bertaccini G, Bosisio G, De Castiglione R, Erspamer V, Goffredo O, Impicciatore M (1968a) Experientia 24: 771-773.
- Anastasi A, Bertaccini G, Erspamer V (1966) Br J Pharmacol Chemother 27: 479-485.
- Anastasi A, Erspamer V, Endean R (1968b) Arch Biochem Biophys 125: 57-68.
- Andersen BN (1984) Scand J clin Lab Invest 44: 5-24.
- Anderson RGW, Pathak RK (1985) Cell 40: 635-643.
- Argos P, Hanei M, Wilson JM, Kelley WN (1983) J Biol Chem 258: 6450-6457.
- Baenziger J, Fiete D (1979) J Biol Chem 254: 9795-9799
- Baeuerle PA, Huttner WB (1984) EMBO J 3: 2209-2215
- Baeuerle PA, Huttner WB (1985) J Biol Chem 260: 6434-6439.
- Baeuerle PA, Huttner WB (1986) Biochem Biophys Res Commun, im Druck
- Balch WE, Dunphy WG, Braell WA, Rothman JE (1984a) Cell 39: 405-416

Balch WE, Glick BS, Rothman JE (1984b) Cell 39: 525-536

Barker WC, Hunt LC, George DG, Yeh LS, Chen HR, Blomquist MC, Seibel-Ross EI, Hong MK, Bair JK, Chen LS, Ledley RS (1986) Protein Identification Resource. Biomedical Research Foundation, Washinton, D.C., USA.

Bartholomev TC, Powell GM, Dodgson KS, Curtis CG (1980) Biochem Pharmacol 29: 2431-2436.

Bergeron JJM, Rachubinski RA, Sikstrom RA, Posner BI, Paient J (1982) J Cell Biol 92:139-146

Bettelheim FR (1954) J Am Chem Soc 76: 2838-2839.

Blombäck B, Boström H, Vestermarck A (1960) Biochim Biophys Acta 38: 502-512.

Blombäck B, Doolittle RF (1963) Acta Chem Scand 17:1819-1822.

Bodanszky M, Martinez J, Priestley GP, Gardner JD, Mutt V (1978) J Med Chem 21: 1030-1035.

Boyd, Shanas (1963) Arch Int Pharmacodyn Ther 144: 6

Brand SJ, Andersen BN, Rehfeld JF (1984a) Nature 309: 456-458.

Brand SJ, Klarlund J, Schwartz TW, Rehfeld JF (1984b) J Biol Chem 259: 13246-13252.

Brennan MD, Mahowald AP (1982) Insect Biochem 12:669-674

Brennan MD, Weiner AJ, Goralski TJ, Mahowald AP (1982) Dev Biol 9: 225-236

Burke B, Matlin K, Bause E, Legler G, Peyrieras N, Ploegh H (1984) EMBO J 3: 551-556

Burnell JN, Roy AB (1978) Biochim Biophys Acta 527: 239-248

- Capasso JM, Abeijon C, Hirschberg CB (1985) J Biol Chem 260: 14879-14884
- Carpenter G, King L Jr, Cohen S (1979) J Biol Chem 254: 4884-4891
- Chamberlain JP (1979) Anal Biochem 98: 132-135
- Chock PB, Rhee SG, Stadtman ER (1980) Ann Rev Biochem 49: 813-843
- Clamp JR, Johnson I (1972) In Gottschalk A (Hrsg.): Glycoproteins. B.B.A. Library Vol. 5 Amsterdam: Elsevier, pp 612-652
- Clarke S (1985) Ann Rev Biochem 54: 479-506.
- Cooper JA, Hunter T (1983) Current Topics Microbiol Immunol 107: 123-161
- Davies SJ, Wheldrake JF (1985) FEMS Micro Lett 30: 353-358.
- Dayhoff MO, Schwartz RM (1981) Ann NY Acad Sci 361: 92-104
- Dayhoff MO (1972): Atlas of Protein Sequence and Structure Vol. 5. National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., pp D87-97, D212-D214.
- Dodgson KS, Rose FA, Tudball N (1959) Biochem J 71: 10-15.
- Dunham JS, Hynes RO (1978) Biochim Biophys Acta 506: 242-255
- Dunphy WG, Rothman JE (1985) Cell 42: 13-21.
- Edman P (1949) Acta Chem Scand 4: 281
- Elbein AD (1981) Trends Biochem Sci August: 219-221
- Elder JH, Pickett RA, Hampton J, Lerner RA (1977) J Biol

Chem 252: 6510-6515

Eng J, Gubler U, Raufman J-P, Chang M, Hulmes JD, Pan Y-CE, Yalow RS (1986) Proc Acad Natl Sci USA 83: 2832-2835.

Farley JR, Nakayama G, Cryns D, Segel IH (1978) Arch Biochem Biophys 185: 376-390.

Farooqui AA (1980) Int J Biochem 12: 529-536

Farquhar MG (1985) Ann Rev Cell Biol 1: 447-488.

Fessler LI, Brosh S, Chapin S, Fessler JH (1986) J Biol Chem 261: 5034-5040.

Finkelstein JD, Martin JJ (1984) J Biol Chem 259: 9508-9513

Fitting T, Kabat D (1982) J Biol Chem 257: 14011-14017

Freedman RB (1984) Trends Biochem Sci 9: 438-441.

Fries E, Gustafsson L, Peterson PA (1984) EMBO J 3: 147-152

Gaal JC, Pearson CK (1986) Trends Biochem Sci. November: 171-175

Gagnon C, Heisler S (1979) Life Sci 25: 933-1000.

Garvey JS, Cremer NE, Sussdorf DH (1977) Methods in Immunology Vol 3, Reading Massachusetts.

Geuze HJ, Slot JW, Strous GJAM, Hasilik A, von Figura K (1985) J Cell Biol 101:2253-2262

Giorgi O, Meek JL (1985) Biochem Pharmacol 34: 45-49

Goldberg D, Kornfeld S (1983) J Biol Chem 258: 3159-3165.

Gregory H, Hardy PM, Jones DS, Kenner GW, Sheppard RC (1964)

- Nature 204: 931-933.
- Gregory RA, Tracy HJ (1964) Gut 5: 103-177.
- Griffiths G, Quinn P, Warren G (1983) J Cell Biol 96: 835-850.
- Griffiths G, Simons K (1987) Science 234:438-443
- Händler AM, Postlethwait JH (1978) J Exp Zool 206: 247-254
- Heldin C-H, Westermark B (1984) Cell 37: 9-20
- Herzog V (1985) Eur J Cell Biol 39: 399-409.
- Heumann R, Kachel V, Thoenen H (1983) Exp Cell Res 145: 179-190
- Hext PM, Thomas S, Rose FA, Dodgson KS (1973) Biochem J 134: 629-635.
- Hickman S, Kornfeld S (1978) J Immunol 121: 990-996
- Hille A, Rosa P, Huttner WB (1984) FEBS Lett 117: 129-134.
- Hilz H, Stone P (1976) Rev Physiol Biochem Pharmacol 76: 1-58
- Hohmann H-P, Gerisch G, Lee RWH, Huttner WB (1985) J Biol Chem 260: 13869-13878.
- Hortin G, Fok KF, Toren PC, Strauss AW (1986b) zur Veröffentlichung vorgelegt
- Hortin G, Sims H, Strauss AW (1986a) J Biol Chem 261: 1786-1793.
- Hortsch M, Meyer DI (1986) Int Rev Cytol 102:215-242

Hovemann B, Galler R, Walldorf U, Küpper H, Bautz EKF (1981)
Nucl Acid Res 9: 4721-4734

Hovemann B, Galler R (1982) Nucleic Acid Res 10: 2261-2274.

Hubbard SC, Ivatt RI (1981) Ann Rev Biochem 50: 555-583

Hung, M-C, Wensink P (1983) J Mol Biol 164: 481-492.

Hunter T (1982) Trends Biochem Sci July: 246-249

Hunter T, Cooper JA (1985) Ann Rev Biochem 54: 897-930.

Hunter T, Cooper JA (1981) Cell: 741-752

Hunter T, Sefton BM (1980) Proc Natl Acad Sci 77: 1311-1315

Huttner WB (1982) Nature 299: 273-276.

Huttner WB (1984) Methods Enzymol 107: 200-223.

Huttner WB, Baeuerle PA, Benedum UM, Friederich F, Hille A, Lee RWH, Rosa P, Seydel U, Suchanek C (1986) In: Nunez J et al. (Hrsg.) Hormones and Cell Regulation, Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd. 139:199-217

Huttner WB, Baeuerle PA (1987) In Satir B (Hrsg.): Modern Cell Biology. New York: Alan Liss Inc, Vol.5 im Druck.

Huttner WB, Lee RWH (1982) J Cell Biol 95:389a

Ingram VM (1957) Nature 180: 326-328

Ivarie RD, Jones PP (1979) Anal Biochem 97: 24-35.

Jevons FR (1963) Biochem J 89: 621-624.

Jones JG, Dodgson KS, Powell GM, Rose FA (1963) Biochem J 87: 548-553

- Jukkola A, Risteli J, Niemelä O, Risteli L, (1986) Eur J Biochem 154: 219-224.
- Karp DR (1983) J Biol Chem 258: 12745-12748.
- Kelly RB (1985) Science 230: 25-32.
- Koehler G, Hengartner H, Shulman MJ (1978) Eur J Immunol 8: 82-88.
- Kornfeld R, Kornfeld S (1980) Structure of Glycoproteins and their Oligosaccharide Units. In: Lennarz WJ (Hrsg.) The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans. New York: Plenum Press S.1-32.
- Kornfeld R, Kornfeld S (1985) Ann Rev Biochem 54: 631-664.
- Klee CB, Crouch TH, Richman PG (1980) Ann Rev Biochem 49: 489-515.
- Krebs EG (1981) Current Topics in Cellular Regulation 18: 401-419.
- Krijgsheld K, Glazenburg E, Scholtens E, Mulder GJ (1981) Biochim Biophys Acta 677: 7-12.
- Kudryk B, Okada M, Redman CM, Blombaeck B (1982) Eur J Biochem 125: 673-682.
- Kükenthal W, Renner M (1980) Leitfaden für das Zoologische Praktikum Stuttgart: Gustav Fischer Verlag
- Kyte J, Doolittle RF (1982) J Mol Biol 157: 105-132
- Laemmli UK (1970) Nature 227: 680-685.
- Lee RWH, Huttner WB (1983) J Biol Chem 258: 11326-11334.
- Lee, RWH and Huttner WB (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82: 6143-6147.

Lipmann F (1958) Science 128: 575-580.

Liu M-C, Lipmann F (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82: 34-37.

Liu M-C, Yu S, Sy J, Redman CM, Lipmann F (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82: 7160-7164.

Liu N, Baenziger JU (1986) J Biol Chem 261: 856-861.

Livesey G (1984) Trends Biochem Sci January, 27-29.

Lodish HF, Kong N, Snider M, Strous GJAM (1983) Nature 304: 80-83

Lottspeich F (1980) Biol Chem Hoppe-Seyler 361: 1829-1834

Lottspeich F (1985) J Chromatogr 326: 321-327

Lowry O, Rosebrough N, Farr A, Randall R (1951) J Biol Chem 193: 265-275

Magee AI, Courtneidge SA (1985) EMBO J 4: 1137-1144.

Mahowald AP, Kambyzellis MP (1980) In Ashburner M, Wright TR (Hrsg.): The Genetics and Biology of Drosophila Vol 2d London: Academic Press, pp 185-189

Matlin KS, Simons K (1983) Cell 34: 233-243.

Meerman JHN, Sterenborg HMJ, Mulder GJ (1983) Biochem Pharmacol 32: 1587-1593.

Mintzas AC, Kambyzellis MP (1982) Insect Biochem 12: 25-33

Mulder GJ (1981a) In Mulder GJ (ed): Sulfation of Drugs and Related Compounds. Boca Raton, Florida: CRC Press Inc., pp 53-82.

Mulder GJ (1981b) In Mulder GJ (ed): Sulfation of Drugs and Related Compounds. Boca Raton, Florida: CRC Press, pp

31-52.

Mulder GJ, Caldwell J, Van Kempen GMJ, Vonk RJ (1982): "Sulfate metabolism and sulfate conjugation". London: Taylor and Francis.

Mutt V (1980) In Glass GBJ (Hrsg.): Gastrointestinal Hormones. New York: Raven Press, pp 169-221

Mutt V, Jorpes JE (1968) Eur J Biochem 6: 156-162.

Nachman RJ, Holman GM, Haddon WF, Ling N (1986) Science 234:71-73

Nakamura K, Compans RW (1977) Virology 79: 381-392.

O'Farrell PH (1975) J Biol Chem 250: 4007-4021

O'Farrell PZ, Goodman HM, O'Farrell PH (1977) Cell 12: 1133-1142

Ouchterlony O (1953) Acta pathol microbiol Scand 32: 231

Paik WK, Kim S (1980) Protein Methylation. John Wiley and Sons, New York

Palau J, Argos P, Puigdomenech P (1982) Intl J Protein Peptide Res 91: 394-410

Paul JI, Hynes RO (1984) J Biol Chem 259: 13477-13487.

Paulsson M, Dziadek M, Suchanek C, Huttner WB, Timpl R (1985) Biochem J 231: 571-579.

Perez M, Hirschberg CB (1986) Biochim Biophys Acta reviews on biomembranes, im Druck.

Petersen TE, Roberts HR, Sottrup-Jensen L, Magnusson S, Badgy D (1976) In Peeters H (ed): Protides of Biological Fluids. New York: Pergamon Press 23: 145-149.

- Pinter A, Compans RW (1975) J Virol 16: 859-866.
- Putnam FW, Florent G, Paul C, Shimoda T, Shimizu A (1973) Science 182: 281-290
- Putnam FW, Tan M, Lynn LT, Easley CW, Migita S (1962) J Biol Chem 237: 717-726
- Reddy EP, Reynolds RK, Santos E, Barbacid M (1982) Nature 300: 149-152
- Redfield RR (1953) Biochim Biophys Acta 10: 344-345
- Reitz HC, Ferrel RE, Fraenkel-Conrat H, Olcott HS (1946) J Am Chem Soc 68: 1024-1031
- Rosa P, Fumagalli G, Zanini A, Huttner WB (1985a) J Cell Biol 100: 928-937.
- Rosa P, Hille A, Lee RWH, Zanini A, De Camilli P, Huttner WB (1985b) J Cell Biol 101: 1999-2011.
- Rosen OM, Krebs EG (1981) Protein Phosphorylation (Book A and B), Cold Spring Harbour Laboratory.
- Roth J, Berger EG (1985) J Cell Biol 93: 223-229.
- Roth J, Taatjes DJ, Lucocq JM, Weinstein J, Paulson JC (1985) Cell 43: 287-295.
- Saraste J, Kuismanen E (1984) Cell 38: 535-549
- Schauer R (1985) Trends Biochem Sci September: 357-360
- Schlossman D, Schmid S, Braell B, Rothman J (1984) J Cell Biol 99: 723-733
- Schmidt MFG (1982) Trends Biochem Sci September: 322-324
- Schmidt ND, Peschon JJ, Chandler CJ, Franco R, Segel IH

(1982) In Mulder GJ, Caldwell J, Van Kempen GMJ, Vonk RJ (Hrsg.): Sulfate Metabolism and Sulfate Conjugation. London: Taylor and Francis, pp 5-12

Schwartz NB, Ostrowski V, Brown KS, Pratt RM (1978) Biochem Biophys Res Comm 82: 173-178.

Schwarz JK, Capasso JM, Hirschberg CB (1984) J Biol Chem 259: 3554-3559.

Schwarz LR (1982) In Mulder et al. (Hrsg.): Sulfate Metabolism and Sulfate Conjugation London: Taylor and Francis S.49-57

Schwarz RT, Datema R (1982) In Horowitz MI (Hrsg.): The Glycoconjugates Vol.3 New York: Academic Press, pp 47-79

Schmidt MFG (1983) Curr Top Microbiol Immunol 102: 101-129.

Segal HL, Mologne LA (1958) J Biol Chem 234: 909-911.

Sekura RD, Jakoby WB (1981) Arch Biochem Biophys 211: 352-359

Seubert PA, Hoang L, Renosto F, Segel IH (1983) Arch Biochem Biophys 225: 679-691.

Shapiro BM, Stadtman ER (1975) J Biol Chem 250: 6264-6272

Simms SS Jr, Johnson DF (1978) J Org Chem 43: 2886

Sommer I, Schachner M (1981) Dev Biol 83: 311-327

Sox HC, Hood L (1970) Proc Natl Acad Sci USA 66: 975-982

Spiro RG (1962) J Biol Chem 237: 646

Sugahara K, Schwartz NB (1979) Proc Natl Acad Sci USA 76: 6615-6618.

Stadler J, Gerisch G, Bauer G, Suchanek C, Huttner WB (1983) EMBO J 2: 1137-1143.

Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CI, Weinberg RA, Papageorge A, Scolnick EM, Dhar R, Lowy DR, Chang EH (1982) Nature 300: 143-149

Tallan HH, Bella ST, Stein WH, Moore S (1955) J Biol Chem 217: 703-708.

Tarentino A, Plummer T, Maley F (1974) J Biol Chem 249: 818-824

Tartakoff A, Vasselli P, Detraz M (1979) J Cell Biol 83: 284-299

Tartakoff AM (1983) Cell 32: 1026-1028.

Tartakoff AM, Hoessli D, Vassalli P (1981) J Mol Biol 150:525-535

Tsang ML-S, Schiff JA (1976) J Bacteriol 125: 923-935.

Tse Y-C, Kirkegaard K, Wang JC (1980) J Biol Chem 255: 5560-5565

Ulrich (1929) J Pharmacol Exp Ther 35:1

Unsworth CD, Hughes J, Morley JS (1982) Nature 295: 519-522.

Uy R, Wold F (1977) Science 198: 890-896

Vaessen RTMJ, Kreike J, Groot GSP (1981) FEBS Letters 124: 193-196

Vargas F, Frerot O, Dan Tung Tuong M, Schwartz JC (1985) Biochemistry 24: 5938-5943.

Warren TG, Mahowald AP (1979) Dev Biol 68: 130-139

Warren TG, Brennan MD, Mahowald AP (1979) Proc Natl Acad Sci 76: 2848-2852

Wenzl S, Sumper M (1986) Devel Biol 115: 119-128.

Wiberg E (1976) Lehrbuch der Anorganischen Chemie. Berlin: Walter de Gruyter S. 342.

Wimmer E (1982) Cell 28: 199-201

Wold F (1981) Ann Rev Biochem 50: 783-814.

Wolff J, Cavelli I (1969) Eur J Biochem 9: 371-377

T a b e l l a r i s c h e r L e b e n s l a u f

Name: Patrick Alexander Baeuerle

Geburtsort: Friedrichshafen

Geburtsdatum: 24. November 1957

Eltern: Edmund Baeuerle, Freier Architekt
Therese Baeuerle, Hausfrau

Familienstand: verheiratet mit Anette Merschbrock-Baeuerle,
Diplom-Verwaltungswissenschaftlerin

derzeitige Adressen:

beruflich: Europäisches Laboratorium für
Molekularbiologie
Meyerhofstr. 1
6900 Heidelberg Tel. 06221-387291

privat: Forststr. 16
8012 Riemerling Tel. 089-6096726

Schulabschluß: Abitur am Karl-Maybach-Gymnasium in
Friedrichshafen am 10.5.1976

Zivildienst: vom 2.11.76 bis 28.2.78 im Städtischen
Krankenhaus Friedrichshafen

Praktikum: vom 29.5.78 bis 11.8.78 als wiss. Hilfs-
kraft o.A. am Max-Planck-Institut für
Biologie in Tübingen bei Priv.-Doz.
Dr. Pelling

Studium: von Oktober 1978 bis Juni 1982 Studium der
Biologie an der Universität Konstanz

Diplomarbeit: von Juli 1982 bis März 1983, angefertigt
am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in
Martinsried in der Nachwuchsgruppe von
Dr. Wieland Huttner

Aufbaustudium: von April 1983 bis Sommer 1986 an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Doktorarbeit: begonnen im April 1983 am Max-Planck-
Institut für Psychiatrie in Martinsried
in der Nachwuchsgruppe von Dr. Wieland
Huttner; fortgesetzt am Europäischen
Laboratorium für Molekularbiologie in
Heidelberg in der Gruppe von Dr. Huttner
im September 1985

